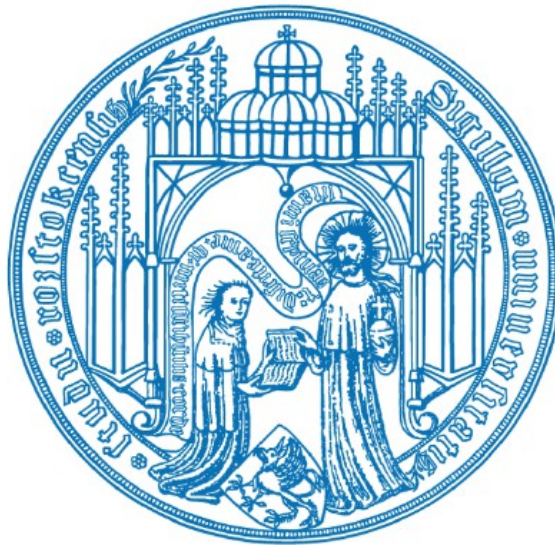


Rudolf-Zenker-Institut für Experimentelle Chirurgie,
Medizinische Fakultät der Universität Rostock
Direktor: Prof. Dr. med. Brigitte Vollmar

*Blockade des Fas-Rezeptors mittels siRNA zur Prävention des
akuten Leberversagens*



Inauguraldissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Universität Rostock
2017

vorgelegt von:
Michael Thrum
geboren am 08.01.1988 in Karl-Marx-Stadt, jetzt Chemnitz

Dekan: Prof. Dr. med. Emil Reisinger

1. Gutachter: PD Dr. rer. nat. Angela Kuhla, Rudolf-Zenker-Institut für Experimentelle Chirurgie,
Universitätsmedizin Rostock
2. Gutachter: Prof. Dr. med. Robert Jaster, Klinik für Innere Medizin, Abteilung Gastroenterologie,
Universitätsmedizin Rostock
3. Gutachter: Prof. Dr. med. Ansgar W. Lohse, I. Medizinische Klinik und Poliklinik, Abteilung
Gastroenterologie, Hepatologie, Infektologie, Tropenmedizin, Universitätsklinikum
Hamburg-Eppendorf

Datum der Einreichung: 14.02.2017

Datum der Verteidigung: 06.12.2017

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung.....	7
1.1 Epidemiologie und klinische Bedeutung des Akuten Leberversagens (ALV).....	7
1.2 Physiologie der Leber und Pathophysiologie des ALV.....	8
1.3 Apoptose.....	11
1.3.1 Signaltransduktion der Apoptose.....	12
1.4 Fas-Rezeptor.....	13
1.4.1 Fas Signaltransduktion.....	13
1.4.2 Physiologie des Fas-Systems.....	14
1.5 Small interfering RNA.....	16
1.6 Fragestellungen und Ziele der Arbeit.....	18
 2 Material und Methoden.....	 19
2.1 Applizierte Substanzen.....	19
2.1.1 DBTC4/Fas siRNA.....	19
2.1.2 DBTC4/Luci siRNA und HEP.....	19
2.2 Intravitale Fluoreszenzmikroskopie (IVM)	19
2.2.1 Fluoreszenzfarbstoffe.....	21
2.3 Modell.....	22
2.3.1 Versuchstiere.....	22
2.3.2 Endotoxinämie-Modell des ALV.....	23
2.3.3 Anästhesie.....	23
2.3.4 Chirurgische Präparation.....	23
2.4 Untersuchungstechniken.....	25
2.4.1 Intravitalmikroskopie der Leber.....	25
2.4.1.1 Auswertung der intravitalmikroskopischen Parameter.....	26
2.4.1.2 <i>Hepatische Mikrozirkulation</i>	26
2.4.1.3 <i>Leukozyten-Endothelzell-Interaktion</i>	26
2.4.1.4 <i>Hepatozelluläre Apoptose</i>	27
2.4.2 Blut-und Gewebeasservierung.....	27
2.4.3 Histologie und Immunhistochemie.....	28
2.4.3.1 <i>Hämatoxylin und Eosin</i>	28
2.4.3.2 <i>Chloracetat-Esterase</i>	29

2.4.3.3 <i>Cleaved Caspase-3</i>	29
2.5 Versuchskinetik des experimentellen Protokolls.....	30
2.6 Experimentelles Protokoll des Tiermodells.....	31
2.7 Überleben.....	31
3 Statistik.....	32
4 Ergebnisse.....	33
4.1 Versuchskinetik und Zielfindung des experimentellen Protokolls.....	33
4.2 IVM.....	36
4.2.1 <i>Hepatische Mikrozirkulation</i>	36
4.2.2 <i>Leukozyten-Endothelzell-Interaktion</i>	38
4.2.2.1 <i>Venuläres Leukozytenrollen</i>	38
4.2.2.2 <i>Venuläre Leukozytenadhärenz</i>	38
4.2.2.3 <i>Sinusoidale Leukozytenstase</i>	40
4.2.3 <i>Hepatozelluläre Apoptose</i>	41
4.3.1 Blutplasma-Analyse der Leberenzyme ALT und AST.....	43
4.3.2 Blutplasma-Analyse von IL-6.....	44
4.4 Histologie/Immunhistochemie.....	45
4.4.1 <i>HE-Histologie</i>	45
4.4.2 <i>CAE</i>	46
4.4.3 <i>Cleaved Caspase-3</i>	48
4.5 Überleben.....	49
5 Diskussion.....	51
5.1 Diskussion der Untersuchungstechniken.....	51
5.2 Diskussion des G/L-induzierten ALV-Modells.....	53
5.3.1 Diskussion des ALV.....	57
5.3.2 Diskussion des Einflusses der DBTC4/Fas siRNA auf das ALV.....	60
5.4 Zusammenfassung.....	67
6 Abkürzungsverzeichnis.....	69
7 Literaturverzeichnis.....	71

8 Eidesstattliche Erklärung.....	81
9 Danksagung.....	82
10 Thesen zur Dissertation.....	84

1 Einleitung

1.1 Epidemiologie und klinische Bedeutung des akuten Leberversagens (ALV)

Das ALV stellt für die moderne Medizin eine große Herausforderung dar und bezeichnet ein schwerwiegendes Krankheitsbild, welches durch einen rapiden Verlust von funktionsfähigem Lebergewebe hervorgerufen wird und zur Beeinträchtigung physiologischer Funktionen der Leber führt. Klinisch imponiert dieses Krankheitsbild durch die beiden Hauptsymptome Enzephalopathie und Koagulopathie und ist vergesellschaftet mit einer hohen Mortalität und Morbidität. Die amerikanische *Acute Liver Failure Study Group* unterscheidet nach zeitlichem Auftreten das hyperakute (< 7 Tage), akute (7 bis 28 Tage) und subakute (28 Tage bis 6 Monate) Leberversagen. Die Prognose ist bei prolongierten Verläufen deutlich schlechter und kann eine Sterblichkeit von 86% erreichen (Canbay et al., 2011). Todesursächlich sind Blutungen, Multiorganversagen, Infektionen und cerebrale Ödeme (Lee, 2012).

Ätiologisch bestehen geographisch deutliche Unterschiede in Bezug auf die verschiedenen Ursachen des ALV. In Industrienationen wie den USA, Großbritannien oder Schweden wird ein ALV am häufigsten durch Medikamente hervorgerufen, wobei die Intoxikation mit Paracetamol in 30 - 50% der Fälle die Hauptursache darstellt. In Deutschland sind bis zu 15% der ALV darauf zurückzuführen. In Entwicklungs- und Schwellenländern dominieren Infektionen hepatogener Viren. In Indien und Pakistan werden 44 - 70% aller ALV durch Hepatitis-B und -E verursacht (Tunon et al., 2009). Eine weitere infektiöse Ursache stellt die Sepsis dar, in deren Rahmen es sekundär zu Organdysfunktionen bis hin zu einem Leberversagen kommen kann. Ursache für eine Sepsis sind in 55,7% der Fälle gram-positive Bakterien, in 54,1% gram-negative, in 17,8% Pilz- und Mischinfektionen (Engel et al., 2007). Seltener, aber ebenfalls klinisch relevante Ursachen stellen Vergiftungen durch Amanitin des Grünen Knollenblätterpilzes, Stoffwechselstörungen wie die Kupferspeichererkrankung Morbus Wilson, Autoimmun-Erkrankungen, das Budd-Chiari-Syndrom und das HELLP-Syndrom (haemolysis, elevated liver enzyme levels, low platelet count) im Rahmen einer Schwangerschaft dar. Allerdings lässt sich in 20 - 40% der ALV-Fälle keine ätiologisch relevante Ursache feststellen (Bernal et al., 2010).

Die Therapie des ALV ist schwierig, da nur bei wenigen Noxen bzw. schädigenden Substanzen gezielt Antidote eingesetzt werden können. Paracetamolintoxikationen werden mit dem Antidot Acetylcystein antagonisiert. Vergiftungen durch das Amanitin des Grünen Knollenblätterpilzes werden mittels Silibinin, kombiniert mit einem β -Lactam-Antibiotikum behandelt. Ein HELLP-Syndrom wird durch Beendigung der Schwangerschaft mittels Sectio caesarea therapiert.

Es gibt nur wenige kausale Therapieoptionen eines ALV. Eine Möglichkeit ist die Organtransplantation (Christ und Brückner 2012). Allerdings verursacht eine Reihe von

Kontraindikationen umfassende Einschränkungen dieses Therapieeinsatzes, sodass diese Option nur bei ausgewählten Patienten eingesetzt werden kann. Zu den absoluten Kontraindikationen einer Transplantation zählen unkontrollierte extrahepatische Infektionen, lebensbedrohliche Systemerkrankungen, bestehender Drogen- oder Alkoholmissbrauch, fortgeschrittene hepatische bzw. extrahepatische maligne Tumorerkrankungen, schwere kardiopulmonale Erkrankungen und Portalvenenthrombosen. Aufgrund der Seltenheit des ALV und des Mangels an Therapieoptionen hat sich die Prognose und Letalität seit Aufkommen der Lebertransplantation vor 30 Jahren nur geringfügig verbessert (Tunon et al., 2009). Neben den zahlreichen Kontraindikationen wird diese Therapieoption weiterhin maßgeblich durch die Knappheit verfügbarer Transplantate beeinflusst (Nussler et al., 2006; Stravitz 2008). Hierdurch entstand eine Vielzahl von Prognosesystemen, um die Organknappheit relativ zu verringern und eine effektivere Nutzung der Transplantate zu erzielen. In der klinischen Routine findet hauptsächlich der *Model for End-stage Liver Disease* (MELD)-Score Anwendung. Die Mortalität der Patienten, die anhand des MELD-Scores auf der Eurotransplant-Liste geführt wird, belief sich 2007 auf 17,9% (Pascher et al., 2013). Dies zeigt deutlich, wie wichtig es ist, dass weitere Therapiestrategien entwickelt und etabliert werden. Überbrückende Leberersatz-Systeme wie das *Molecular Adsorbents Recirculation System* oder *Prometheus* kommen in einigen medizinischen Zentren zum Einsatz, verbessern allerdings Prognose und Überleben der Patienten nicht (Lee, 2012).

1.2 Physiologie der Leber und Pathophysiologie des ALV

Die Ursache für die erheblichen Schwierigkeiten beim Ersatz der Leberfunktion ist ihre zentrale Rolle im Stoffwechsel. Die Leber ist mit einem durchschnittlichen Gewicht von 1500 - 2000 g die größte Drüse des menschlichen Körpers. Zu ihren Aufgaben gehören Entgiftung, Ausscheidung, Speicherung und Synthesevorgänge. Die Leber baut mithilfe von Cytochrom P450-abhängigen Enzymen Bilirubin, Ammoniak, Steroidhormone, Medikamente und Giftstoffe ab. Weiterhin synthetisiert die Leber Proteine, darunter Gerinnungsfaktoren, Albumin, Akute Phase Proteine, Cholesterin, Glucose und Ketonkörper, welche aus in der Leber gespeichertem Glykogen und Fettsäuren gebildet werden. Des Weiteren speichert die Leber die fettlöslichen Vitamine A, D, E und K. Die Leber liegt dem gastrointestinalen Blutfluss über die Vena (V.) portae nachgeschaltet und ist dadurch einer Vielzahl verschiedener Moleküle von Nahrungsbestandteilen, Strukturen der Darmkommensalen und potentiellen Infektionserregern ausgesetzt, die über den Magen-Darm-Trakt aufgenommen werden. Dadurch kommt der Leber auch eine Rolle in der Vermittlung der primären Immunantwort zu. Die Leber besteht deshalb neben Hepatozyten, welche die Hauptmasse der Leber ausmachen, auch aus Zellen, die dem angeborenen Immunsystem

angehören und die anhand ihrer Rezeptorausstattung körperfremde Moleküle wie pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) und körpereigene damage-associated molecular patterns (DAMPs) erkennen (Vollmar und Menger, 2009). DAMPs bezeichnen körpereigene charakteristische Strukturen, die das angeborene Immunsystem als Zeichen einer Schädigung erkennt und eine Immunantwort zur Folge haben. Dazu gehören endogene Moleküle wie z.B. DNA, Histone, Nucleophosmin, mitochondriale Proteine (Kubes und Mehal, 2012) und das high-mobility-group-protein B1 (HMGB1), ein Protein, welches Funktionen im Rahmen der Transkription und Erhaltung der DNA-Struktur erfüllt (Denk et al., 2012). Zu PAMPs gehören Zellwand- und spezifische DNA-Bestandteile von Bakterien und Pilzen wie das Lipopolysaccharid (LPS), welches einen charakteristischen Zellmembranbestandteil gram-negativer Bakterien darstellt (Denk et al., 2012). PAMPs, die in den Organismus gelangt sind, werden über spezifische Mustererkennungsrezeptoren, pattern recognition receptors (PRR), erkannt. Über den Oberflächenrezeptor cluster of differentiation (CD) 14 und den assoziierten toll-like receptor (TLR) wird bei Anlagerung von lipopolysaccharide binding protein (LBP) gebundenem LPS eine intrazelluläre Signalkaskade ausgelöst, die den Transkriptionsfaktor nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells (NF- κ B) aktiviert. NF- κ B verstärkt die Expression pro- und antiinflammatorischer Gene und gilt als wichtiger Vermittler von Immunreaktionen (Cohen, 2002; Hörner et al., 2004).

Gelangt LPS in die Lebersinusoide, kommt es zur Erkennung dieser u.a. durch Kupffer-Zellen (KC), Makrophagen und Monozyten, welche nach Aktivierung verschiedene proinflammatorische Zytokine wie Interleukin (IL)-1, IL-6 und den Tumornekrosefaktor (TNF)- α ausschütten. Weiterhin kommt es auch zu einer Aktivierung des Komplementsystems. Der Faktor C5a stellt einen eigenständigen chemotaktischen Stimulus für Neutrophile Granulozyten (PMNs) dar und verstärkt die anlaufende Immunreaktion zusätzlich (Riedemann et al., 2002). Durch die Chemotaxis kommt es zu einer Akkumulation von PMNs in der Leber (Jaeschke und Hasegawa, 2006). Die Akkumulation beginnt vier Stunden nach z.B. Endotoxinexposition und zwischen der vierten und siebten Stunde nach Exposition kommt es zur Extravasation der PMNs in das Lebergewebe. Dies korreliert zeitlich mit dem Auftreten des Leberparenchymschadens im ALV (Chosay et al., 1997) und deutet dabei die Relevanz der PMNs und des angeborenen Immunsystems in der Pathophysiologie des ALV an. PMNs sammeln sich hauptsächlich in den Lebersinusoiden und postsinusoidalen Venolen und wandern in das Leberparenchym ein, um eingedrungene Erreger zu phagozytieren. PMNs sezernieren hierbei reaktive Sauerstoffspezies (ROS) und Proteasen, welche zu einer beträchtlichen kollateralen Schädigung des umgebenden Leberparenchyms führen (Wagner und Roth, 1999). Ebenso sezernieren in Apoptose befindliche Hepatozyten proinflammatorische chemotaktische Mediatoren und DAMPs, die eine verstärkte Rekrutierung von

Immunzellen zur Folge haben (Jaeschke, 2002). Dabei kommt dem Todesrezeptor-vermittelten Zelltod von Hepatozyten eine wichtige Rolle zu, denn dieser führt zur Induktion der Proteinsynthese von macrophage inflammatory protein 2 und IL-8, welche eine Rekrutierung von PMNs *in vivo* verursachen (Faouzi et al., 2001). Die von KC und apoptotischen Hepatozyten ausgeschütteten Mediatoren bedingen weitere pathophysiologische Veränderungen, welche die Schädigung des Lebergewebes vorantreiben. So beginnt das Endothel die Adhäsionsmoleküle E-Selektin, P-Selektin und das intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 zu exprimieren, wodurch die Extravasation von Immunzellen begünstigt wird. Endothelzellen synthetisieren vermehrt Stickstoffmonoxid, einen starken Vasodilatator, Endothelin-1, einen starken Vasokonstriktor und produzieren vermehrt tissue factor, der zu einer Aktivierung der Gerinnungskaskade führt. Durch den schädigenden Einfluss von Endotoxinen und Zytokinen verlieren die Endothelien ihre Barrierefunktion und es kommt zu einer Ödembildung (Aird, 2003). Das Überwiegen der Sternzell- und Endothelin-1-vermittelten Vasokonstriktion, das inflammationsbedingte Endothelzellödem und die Hyperkoagulabilität der Gerinnung verursachen einen Perfusionsverlust des Leberparenchyms (Vollmar und Menger, 2009). Die aus der gestörten Makro- und Mikrozirkulation resultierende Sauerstoffunterversorgung des Lebergewebes löst weitere Zelluntergangsvorgänge und eine Immunzellrekrutierung aus. Die Leber ist als zentrales Stoffwechselorgan, deren Biosyntheseleistungen, Speicherfunktionen und Sekretionsvorgänge einer hohen Energieversorgung bedürfen, besonders anfällig für hypoxische und ROS induzierte Schäden (Malhi et al., 2006). Diese verschiedenen schädigenden Einflüsse führen zur Zerstörung des Leberparenchyms durch unterschiedliche Zelltodmechanismen, deren Genese von der Verfügbarkeit von Sauerstoff und Energie in Form des zellulären Energiespeichers Adenosintriphosphat (ATP) abhängt (Formigli et al., 2000; Paxian et al., 2003).

Der Perfusionsverlust, die gesteigerte Chemotaxis und Aktivierung von PMNs sowie apoptotische und nekrotische Zelluntergangsvorgänge führen zu einer Aggravierung der Schädigung, sodass sich hier zahlreiche Mechanismen des Immunsystems in einem komplexen Zusammenspiel gegenseitig beeinflussen und es im Sinne eines *circulus vitiosus* nach einer initialen Schädigung zur weiteren Aggravierung durch die körpereigene Immunantwort kommt, deren Kollateralschäden eine weitere Immunzellrekrutierung und Schädigung verursachen, welche abhängig vom Ausmaß des geschädigten Leberparenchyms in eine Dysfunktion bis hin zu einem Organversagen mündet (Kapral, 2005; Vollmar und Menger, 2009; Canbay et al., 2011).

1.3 Apoptose

Das ALV wird durch den Verlust von funktionsfähigem Lebergewebe aufgrund von ausgedehnten Leberzellnekrosen und -apoptosen verursacht (Berr et al., 2005; Rutherford et al., 2008). Apoptose bezeichnet eine Form des programmierten Zelltodes, welcher als vorrangiger Zelluntergangsmechanismus im Vorgang des ALV angesehen wird (Eipel et al., 2004; Li et al., 2004; Le Minh et al., 2007). Die Apoptose ist ein physiologischer Vorgang, um die Zellhomöostase in Geweben und Organen zu erhalten. Sie spielt eine Rolle beim Wachstum von Geweben und Organen, der Abtötung entarteter sowie geschädigter, virusbefallener Zellen, der Erhaltung neuronaler Plastizität (Desbarats et al. 2003), der Immunzellreifung und -modulation und im Rahmen der sogenannten Immunprivilegiertheit spezifischer Gewebe (Nagata, 1997). Die Apoptose wird durch verschiedene Faktoren hervorgerufen, wie die Schädigung der DNA durch ionisierende Strahlung, Medikamente, Chemikalien, extrinsische Apoptosesignale oder den Entzug von Wachstumsfaktoren (Mignotte und Vayssiere 1998).

Charakteristische Veränderungen der Apoptose sind die Schrumpfung der Zelle mit Loslösung aus dem Zellverband. Die DNA wird dabei fragmentiert und das Chromatin verdichtet sich. Aus der ehemaligen Zelle schnüren sich Vesikel, sogenannte Apoptosekörperchen ab, die phagozytiert werden, damit kein immunogener Zelldetritus zurückbleibt. Die Vorgänge während der Apoptose bedürfen einer großen Menge an Energie in Form von ATP und sind charakterisiert durch die Aktivität von sog. Caspasen. Apoptose und Nekrose wurden aufgrund ihrer Eigenschaften und ihrer Gestalt lange Zeit als verschiedene Prozesse angesehen (Schwarz und Bennet, 1995). Vielmehr handelt es sich bei der Nekrose um einen Vorgang, der sich an die Erschöpfung der Energiereserven in Form von ATP einer Zelle anschließt (Lemasters, 1999). Hierbei kommt es zur Ionendysregulation mit Schwellung der Zelle und Ruptur der Zellmembran, sodass Zellbestandteile als DAMPs im Gewebe zurückbleiben und eine lokale Immunantwort auslösen. Des Weiteren lassen sich hiervon Übergangsformen abgrenzen, die als Aponekrose, Paraptose und Nekroptose bezeichnet werden (Formigli et al., 2000; Sperandio et al., 2000). Paraptose und Aponekrose stellen Mischformen der Zelluntergangsmechanismen dar. Die Aponekrose ist durch apoptosetypische Vorgänge wie die DNA Fragmentation und Zellkerndegradation charakterisiert, beinhaltet allerdings auch degenerative Zeichen wie die Zellschwellung und Zellmembranzerstörung der Nekrose. Bei der Aponekrose kommt es im Verlauf einer Apoptose zu hypoxischen Zellschäden, welche die Energiereserven der Zelle angreifen und zu sekundären nekrotischen Schäden führen (Formigli et al., 2000). Der Begriff der Paraptose bezeichnet die Zellselbstauflösung unter zytoplasmatischer Vakuolisierung und mitochondrialer Schwellung, jedoch ohne DNA-Fragmentierung, Chromatinverdichtung oder Formung apoptotischer Vesikel

(Sperandio et al., 2000).

1.3.1 Signaltransduktion der Apoptose

Es sind unterschiedliche Signaltransduktionswege der Apoptose bekannt. Dabei handelt es sich um den extrinsischen, den intrinsischen und den Granzym B Weg. Der extrinsische Weg ermöglicht Zellen das Empfangen eines Apoptosesignals über ein Rezeptor-Ligand-System. Zu diesen Rezeptoren gehören der Fas Rezeptor (FasR), Tumor-Nekrosefaktor-Rezeptor-1 (TNFR-1), death receptor-3, death receptor-4 und der death receptor-5 (Budihardjo et al., 1999).

Das Prinzip der Signalvermittlung funktioniert in den Rezeptorsystemen Fas und TNF analog. Die Anlagerung des Liganden an den, auf der Zelloberfläche befindlichen, komplementären Rezeptor führt zu dessen Konformationsänderung. Dadurch werden intrazelluläre Rezeptor-assoziierte Proteine angelagert und aktiviert, welche weitere Vorläuferproteine wie die Initiatorcaspase-8 in ihre aktivierte Form umwandeln. Caspasen sind Cysteinproteasen, die Proteine hinter der Aminosäure Aspartat schneiden. Initiatorcaspasen liegen als Monomere inaktiv im Zytoplasma vor und werden durch Dimerisierung aktiviert (Boatright et al., 2003). Indem diese Initiatorcaspasen durch proteolytische Spaltung zunächst Caspase-9 aktivieren, die in einem weiteren Schritt die Effektorcaspase-3 in ihre aktive Form umwandelt, sorgen sie für die Auslösung des Apoptosesignals. Effektorcaspasen führen zur Aktivierung von Proteasen und Endonukleasen, die mit der Fragmentation des Zytoskeletts und der DNA beginnen und damit den Zellabbau einleiten. Das DNA Reparaturenzym DNA-dependent protein kinase wird durch Caspase-3 inaktiviert, sodass das Vermögen der Zelle, DNA-Schäden zu reparieren, reduziert wird. Dadurch kommt es zu einer vereinfachten und schnelleren DNA-Fragmentation während der Apoptose (Song et al., 1996). Caspase-6 baut das Intermediärfilament Lamin ab, welches einen Hauptbestandteil der Zellkernhülle darstellt (Takahashi et al., 1996). Durch den Abbau der Strukturproteine Aktin und Fodrin kommt es aufgrund des Zusammenbruchs des Zytoskeletts zur charakteristischen Schrumpfung der Zelle mit Umstrukturierung in zellmembran-umgebene Vesikel, den sogenannten Apoptosekörperchen (Martin et al., 1995; Mashima et al., 1995).

Zellen sind Apoptosesignalen allerdings nicht hilflos ausgeliefert, vielmehr kommt es im Verlauf der Apoptose abhängig vom Stimulus auch zur Induktion und Aktivierung anti-apoptotischer Faktoren. Erst wenn der Einfluss pro-apoptotischer Faktoren überwiegt, wird die zur Apoptose führende Signalkaskade ausgelöst (Shishodia und Aggarwal, 2002). Zu den anti-apoptotischen Faktoren zählen B-cell lymphoma (Bcl-2), Bcl-xl, FLICE (FADD-like IL-1 β -converting enzyme)-inhibitory protein (cFLIP) und der, auch in der Pathophysiologie einer Entzündung wichtige Transkriptionsfaktor NF- κ B.

1.4 Fas-Rezeptor

Der FasR ist einer der Aktivatoren von NF- κ B. Er wird auch als CD95 bezeichnet und gehört zur Klasse der TNFR-Superfamilie. Bei FasR handelt es sich um ein ursprünglich als *death receptor* entdecktes Transmembranmolekül mit drei extrazellulären Cystein-reichen Wiederholungseinheiten, einem transmembranären Anteil und einer intrazellulären sog. *death domain* bestehend aus ~ 80 Aminosäuren. Im Laufe der Zeit wurden zahlreiche weitere Funktionen von FasR entdeckt, darunter Differenzierungs-, Wachstums- oder Entzündungsvorgänge (Brint et al., 2013). FasR wird ubiquitär, besonders in Leber-, Herz-, Thymus-, und Nierengewebe exprimiert (Nagata, 1997).

Die FasR komplementäre Struktur ist der Fas Ligand (FasL). Er ist ein Typ-II-Membran-Protein und gehört zur Klasse der TNF. Der Ligand wird nahezu ausschließlich auf aktivierten T-Lymphozyten und natürlichen Killerzellen exprimiert. Der Ligand kann beim Menschen in membranständiger und in einer abgespaltenen, löslichen Form im Blutkreislauf vorkommen (Nagata, 1997). Bei Anlagerung des Liganden an den FasR werden unterschiedliche Signaltransduktionswege aktiviert, in deren Ergebnis es zur Apoptose oder auch Proliferation der Zelle kommen kann. Einer dieser Einflussfaktoren ist beispielsweise die Form des angelagerten Liganden. In membranständiger Form ist die apoptotische Potenz des Liganden höher als in abgespaltener Form, sodass der abgespaltene Ligand die Apoptose eher zu blockieren scheint (Suda et al., 1997; Schneider et al., 1998).

1.4.1 Fas Signaltransduktion

Die Anlagerung des FasL an den FasR führt zur Zusammenlagerung der extrazellulären Domänen des Rezeptors und damit zur Weiterleitung des Signals zur intrazellulären Domäne, wo es zu einer Konformationsänderung der death domain kommt (Scott et al., 2009). Diese Konformationsänderung führt zur Anlagerung der Fas associated death domain (FADD), welche daraufhin die Initiatorcaspase Pro-Caspase-8 aktiviert. Der Komplex aus FasR, FADD und Pro-Caspase-8 wird als death inducing signaling complex (DISC) bezeichnet. Zu Beginn der Forschungsarbeiten zu Fas gab es widersprüchliche Ergebnisse und Berichte zur Auswirkung der anti-apoptotischen Proteine Bcl-2 und Bcl-xL. Einige Berichte zeigten, dass die Expression von Bcl-2 und Bcl-xL die Fas-vermittelte Apoptose blockiert, während andere Studien dies nicht nachweisen konnten (Wajant, 2014). Durch einen Vergleich zweier Lymphozytenpopulationen kam es zur Unterteilung in Typ I- und Typ II-Zellen (Scaffidi et al., 1998). Bei den Typ I-Zellen, die durch

den extrinsischen Signalweg aktiviert werden, kommt es zur Anlagerung zahlreicher weiterer Pro-Caspasen-8 in Form einer Kette an DISC, welche dann durch Dimerisierung und Autoaktivierung eine suffiziente Signalweiterleitung und Apoptoseauslösung durch die direkte Aktivierung der Effektor-Caspasen-3, -6 und -7 verursachen. Dies erfordert allerdings die Internalisierung des FasR in endosomale Vesikel (Lee et al., 2006).

Zunächst wurde angenommen, der intrinsische Signalweg unterscheide sich vom zuvor beschriebenen extrinsischen Weg durch eine geringere Aktivität des DISC und der Pro-Caspasen-8. Zahlreiche Studien legten allerdings eine Schlüsselrolle des X-linked inhibitor of apoptosis nahe (Ndozangue-Touriguine et al., 2008; Vogler et al., 2008; Jost et al., 2009; Wilson et al., 2009). Eine weitere Gemeinsamkeit dieser Studien ist die Relevanz der Mitochondrien beim intrinsischen Signalweg als Signalverstärker (Barnhart et al., 2003). Caspase-8 führt zur Aktivierung des BH3 interacting-domain death agonist, welcher nach Translokation in das Mitochondrium über Bcl-2 zur Freisetzung der pro-apoptotischen Moleküle Cytochrom C und second mitochondria-derived activator of caspase führt. Cytochrom C bildet daraufhin durch Zusammenlagerung mit mehreren apoptotic protease-activating factor 1 den Multiproteinkomplex Apoptosom, welcher zur Aktivierung der Caspase-9 führt, die wiederum die Effektorcaspasen aktiviert.

1.4.2 Physiologie und Pathophysiologie des Fas-Systems

Fas wird ubiquitär, aber auch besonders auf Hepatozyten exprimiert. Physiologisch erfüllt die Fas-vermittelte Apoptose verschiedene Funktionen im Rahmen des Immunsystems. In Heranreifung befindliche autoreaktive T-Zellen werden während ihrer Entwicklung im Thymus erkannt und zerstört. Die Aussortierung reifer, aktivierter T-Lymphozyten zur Regulierung einer laufenden Entzündungsreaktion gehört zu den Aufgaben des Systems (Nagata und Golstein, 1995). Virusbefallene körpereigene Zellen werden durch FasL-tragende Lymphozyten erkannt und zerstört, um Infektionen zu limitieren. Weiterhin übernimmt das FasR/FasL-System noch die Funktion der sogenannten Immunprivilegiertheit. Organe wie Auge oder Hoden zeigen nur eine geringe Toleranz gegenüber Zellschäden. Es existiert ein Mechanismus, der diesen Geweben ermöglicht, mittels FasL-tragenden Zellen infiltrierende Entzündungszellen, z.B. aktivierte Lymphozyten zu eliminieren und so dem Zugriff des Immunsystems zu entgehen (Griffith et al., 1995). Einer der ersten Hinweise darauf, dass FasR nicht nur Apoptose vermittelt, war die Verstärkung der Proliferation von CD3-aktivierten T-Zellen durch die Stimulation von FasR (Alderson et al., 1993), wobei naive T-Zellen zunächst resistent gegenüber FasR-vermittelter Apoptose waren, sich allerdings nach 6-7 Tagen nach Aktivierung der T-Zelle eine Anfälligkeit gegenüber FasR-vermittelter Apoptose entwickelte (Klas et al., 1993). Dies scheint abhängig

davon zu sein, mit welchen Antigenen eine T-Zelle Kontakt hatte und ob eine Co-Stimulation durch CD28 oder den *inducible costimulator* stattfindet (Desbarats et al., 1999). Es schlossen sich zahlreiche Studien an, die weitere Funktionen und Signalwege von FasR aufzeigten. Eine Funktion erfüllt das FasR/FasL-System im Rahmen von Differenzierung und Proliferation von Nervengewebe, indem es Neuriten zum Wachstum und zur Verzweigung stimuliert (Lambert et al., 2003). In einem tierexperimentellen Modell einer kontrolliert-traumatischen kortikalen Kontusion vermittelte die Aktivierung von FasR initial den apoptotischen Untergang des Gewebes und im weiteren Verlauf die Verzweigung und Regeneration des geschädigten Nervengewebes (Beier et al., 2007). Dies ist auf intrazellulärer Ebene durch Aktivierung von Ezrin, ein Protein, das transmembranäre Bestandteile mit dem Zytoskelett verbindet, reguliert. Auch Rac1 und ERK scheinen bei der Signalübertragung und Regulation der Verlängerung und Verzweigung von Neuriten und anderen morphologischen Veränderungen eine wichtige Rolle zu spielen (Ruan et al., 2008). Eine weitere wichtige Funktion von FasR ist die Veränderung der Zytoskelettmorphologie. Dadurch beeinflusst Fas die Migrationsfähigkeit von Zellen. Dieser Erkenntnis sind zahlreiche Studien gewidmet, die sich mit der Invasivität von Tumoren beschäftigen (Barnhart et al., 2004; Li et al., 2009; Trauzold et al., 2005). FasL führt bei apoptoseresistenten Tumorzellen über eine NF- κ B- und konsekutive Aktivierung der MAP-Kinasen Erk1/2, JNK1/2, p38 und einer Induzierung des urokinase plasminogen activator Gens zu einer verstärkten Motilität von Tumorzellen und damit zu einer erhöhten Invasivität (Barnhart et al. 2004). Der genaue Signalweg, über den FasR NF- κ B aktiviert, ist nicht bekannt (Brint et al., 2013). Eine weitere wichtige Funktion von FasR ist die Vermittlung von Immunreaktionen, indem er indirekt zu einer Rekrutierung von PMNs führt (Faouzi et al., 2001; Jaeschke, 2002; Messer et al., 2013). Entdeckt wurde dieser Mechanismus in Fas-L überexprimierenden Geweben. Durch die FasL-Überexpression kommt es beispielsweise in pankreatischem Gewebe zur Akkumulation von PMNs, welche durch die Zerstörung von Langerhans-Inseln Diabetes mellitus verursachen (Kang et al., 1997). In der Literatur wird FasR weiterhin eine pathophysiologische Relevanz in der Entwicklung spezifischer immunologisch-vermittelter Erkrankungen, wie dem acute respiratory distress syndrome (Farnand et al., 2011), der Mukoviszidose (Becker et al., 2012) und der Arthritis (Ma et al., 2004) zugeschrieben. Dieser Einfluss auf Inflammationsvorgänge scheint durch eine NF- κ B-, p38-, JNK-, und ERK MAP-aktivierte Zytokinausschüttung (Packham et al. 1997; Palao et al., 2006; Zhang et al., 2009) vermittelt zu sein. Fas induziert hierbei IL-6, IL-8, IL-1 β , TNF- α , IP-10, MCP-1 und Prostaglandin E2 (Brint et al. 2013).

Damit gehören die zwei wichtigsten Faktoren der Pathophysiologie des ALV, Apoptose und eine Reaktion des angeborenen Immunsystems, zu den physiologischen Funktionen von Fas. Der FasR stellt somit ein geeignetes Therapietarget zur Behandlung des ALV dar. So konnte bereits

gezeigt werden, dass Fas-defiziente Mausstämmen nach *Propionibacterium acnes*-Behandlung resistent gegenüber LPS-vermittelter Hepatozytenschädigung waren (Kondo et al., 1997).

Allerdings hätte eine systemische Defizienz durch die vielseitigen Funktionen von Fas schwere Nebenwirkungen. Mausstämmen mit FasR-Gendefekten und einer daraus resultierenden loss-of-function-Mutation zeigen symptomatisch Lymphadenopathien und eine Splenomegalie aufgrund einer Vermehrung von CD4- und CD8-positiven Zellen (Watanabe-Fukunaga et al., 1992). Pathologische Veränderungen des FasR/FasL-Systems beim Menschen manifestieren sich in Form eines autoimmunen lymphoproliferativen Syndroms, welches durch Mutationen im Fas-Gen hervorgerufen wird. Symptomatisch treten dabei chronische Lymphadenopathien, Splenomegalie, Autoimmun-Erkrankungen und eine erhöhte Wahrscheinlichkeit für die Entwicklung eines B-Zell-Lymphoms in Erscheinung (Rieux-Laucat et al., 1995; Hansford et al., 2013).

Die Verabreichung von Antikörpern stellt in unserer modernen Medizin eine aktuelle und vielseitig einsetzbare Therapiemethode dar. Da allerdings die systemische Applikation eines rekombinanten Antikörpers gegen FasR tierexperimentell bei Mäusen zu einem fulminanten Leberversagen mit letalem Ausgang führt (Nagata, 1997; Wilson et al., 2009), ist es nicht möglich auf diesen Therapieansatz zurückzugreifen. Des Weiteren wäre die systemische Verabreichung nicht in der Lage, ausgewählte Gewebe zu erreichen, sondern würde schwere systemische Nebenwirkungen zu Folge haben. Allerdings gibt es einen Mechanismus, der gezielt die Expression spezifischer Proteine in Geweben regulieren kann. Bei diesem Mechanismus handelt es sich um die RNA-Interferenz.

1.5 Small interfering RNA

Die RNA-Interferenz ist ein evolutionär konservierter Mechanismus, der Funktionen im Rahmen der post-transkriptionellen Gen-Stillegung, dem sog. *silencing*, der Virusabwehr (Ratcliff et al., 1997) und der Erhaltung der Genomstruktur erfüllt (Volpe et al., 2003; Joshua-Tor und Hannon, 2011).

Bei der physiologisch in allen Zellen vorkommenden microRNA (miRNA) handelt es sich um nicht-kodierende, nicht-translatierte RNA-Moleküle. Zellen spezifischer Gewebearten haben ein charakteristisches miRNA-Profil. MiR-1 wird beispielsweise bevorzugt in Herzwert, miR-122 in Leberzellen exprimiert (Bartel, 2004). Bei siRNA handelt es sich um einzel- oder doppelsträngige, 19 bis 25 Basenpaare lange RNA-Sequenzen, die Zellen künstlich zugeführt werden können. Die durch eine RNA-Polymerase transkribierten Vorläufermoleküle werden als pri-miRNA bezeichnet. Die Reifung von miRNA wird durch zwei Enzyme gesteuert. Im Zellkern wird ein Ende der pri-miRNA durch das Enzym Drosha prozessiert, dadurch entsteht die pre-miRNA. Der zweite Schritt

vollzieht sich im Zytoplasma. Durch die Abtrennung des schleifigen Endes der pre-miRNA mittels des Enzyms Dicer entsteht die endgültige miRNA. Eine schematische Darstellung dieser Vorgänge zeigt Abbildung (Abb.) 1. Das Enzym Dicer stellt eine Schnittstelle in der Prozessierung von mi- und siRNA dar, denn es katalysiert ebenfalls die Zerlegung exogener siRNA oder viraler RNA. Die Produkte sind in charakteristischer Form aufgebaute, doppelsträngige RNA-Moleküle, welche über eine Aufnahme in einen weiteren Enzymkomplex ihre Funktion erfüllen. Dieser Komplex wird als RNA-induced silencing complex (RISC) bezeichnet und ist ein Ribonukleasekomplex, dessen funktionelle Einheit ein Enzym der Argonauten-Proteinfamilie enthält. Während der Prozessierung von miRNA oder siRNA im RISC werden doppelsträngige Sequenzen gespalten und verbleiben als sog. Leitstrang. Anhand dieses Leitstranges erkennt der RISC komplementäre mRNA-Sequenzen, die abgebaut werden sollen. Dadurch wird der Zusammenbau des jeweiligen Proteins am Ribosom verhindert.

Small interfering RNA ist einfach in der Entwicklung, bietet eine hohe Selektivität und geringe systemische Toxizität (Malhi et al., 2006). Die nachteilige Fragilität einer solchen siRNA im Blutkreislauf lässt sich durch verschiedene Trägersubstanzen verhindern, welche, ausgestattet mit spezifischen Rezeptoren, sogar die gezielte Einbringung der siRNA in bestimmte Gewebe ermöglichen. So wurde in der vorliegenden Studie eine DBTC4/Fas siRNA mit einer leberspezifischen Lipoplex-Formulierung eingesetzt, die gezielt die Expression des FasR auf Hepatozyten herabregulieren und ein LPS induziertes ALV bei den Mäusen verhindern soll.

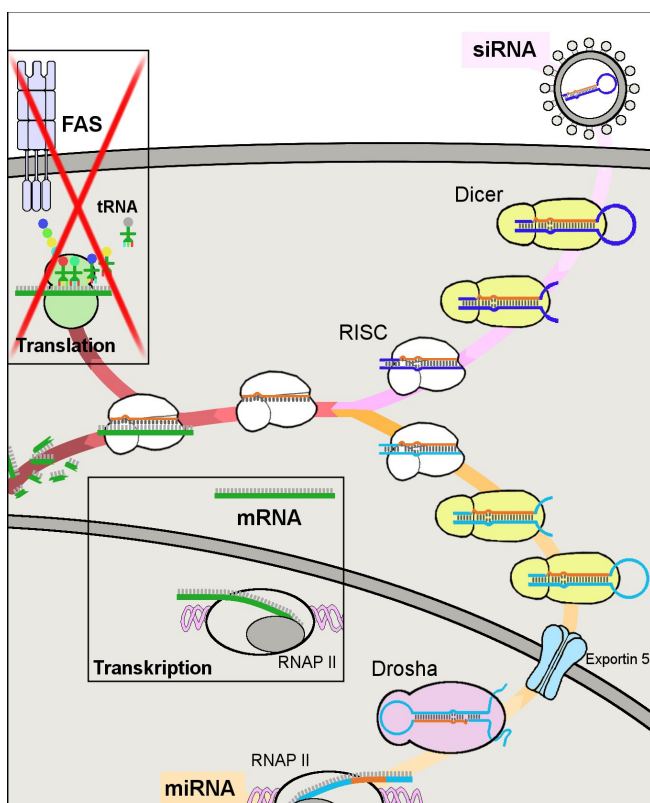


Abb. 1: Schematische Darstellung der RNA-Interferenz. Dargestellt sind die intrazellulären Vorgänge, welche von außen zugeführte siRNA und endogen prozessierte miRNA durchlaufen, um den Abbau komplementärer mRNA-Stränge einzuleiten. RNA Polymerase II (**RNAP II**), RNA induced silencing complex (**RISC**).

1.6 Fragestellungen und Ziele der Arbeit

Die vorliegende Studie untersucht den Einfluss einer FasR-Blockade mittels siRNA auf ein tierexperimentelles ALV. Die Evaluation der Leberschädigung erfolgte mit der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie, die unterstützend durch histologische, immunhistochemische, molekularbiologische und laborchemische Untersuchungen verifiziert wurde. Folgende Fragestellungen wurden untersucht:

1. Führt die Applikation einer FasR-siRNA zu einer Verringerung der hepatischen FasR-Expression?
2. Ist die von Silence Therapeutics entwickelte Lipoplex-Formulierung DBTC4 leberspezifisch oder wird die FasR-Expression in anderen Geweben beeinflusst?
3. Beeinflusst die Herabregulation der hepatischen FasR-Expression das Perfusionsversagen, die Apoptose und Nekrose, die wichtige Rollen in der Pathophysiologie des ALV spielen?
4. Beeinflusst die Herabregulation der hepatischen FasR-Expression die konsekutive Entzündungsreaktion, die sich in Form einer Akkumulation neutrophiler Granulozyten bzw. der Leukozyteninfiltration des Lebergewebes zeigt?
5. Führt das silencing von FasR zu einer geringeren Mortalität des ALV?

2 Material und Methoden

2.1 Applizierte Substanzen

2.1.1 DBTC4/Fas siRNA

Die DBTC4/Fas siRNA richtet sich gegen die mRNA des FasR. Basenabfolge des Leitstranges: 5'-GCAUCUCCGAGAGUUUAAA-3'. Durch eine spezielle Lipoplexhülle wird diese siRNA bevorzugt von Hepatozyten aufgenommen und verstoffwechselt, wodurch sich eine spezifische Blockade der FasR-Expression auf Hepatozyten ergibt. Die Herstellung dieser siRNA erfolgte durch Silence Therapeutics AG, Berlin.

2.1.2 DBTC4/Luci siRNA und HEP

Die DBTC4/Luci siRNA ist ebenfalls eine von Silence Therapeutics AG hergestellte siRNA mit einer Abfolge von Aminosäuren, welche jedoch keiner spezifischen mRNA-Sequenz und somit keinem Zielprotein entspricht. Basenabfolge: 5'-AUCACGUACGCGGAAUACUUCGA-3'. Dieses Agens diente zur Überprüfung, ob das alleinige Vorhandensein einer siRNA zu einer Herabregulation des hepatischen FasR führt, indem es die Homöostase der RNA-Interferenz beeinflusst.

2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEP) ist die Trägersubstanz zur Darreichung der siRNA und wurde appliziert, um auszuschließen, dass die Pufferlösung *per se* Veränderungen der FasR-Expression hervorruft.

2.2 Intravitale Fluoreszenzmikroskopie

Fluoreszenz bezeichnet die Emission von Licht durch ein Material. Zur Fluoreszenz befähigte Stoffe können mit Licht einer bestimmten Wellenlänge angeregt werden. Hierbei werden Photonen absorbiert. Das durch eine solche Absorption hervorgerufene höhere Energieniveau kann nicht gehalten werden. Dadurch kommt es unter Energieverlust zur Abgabe dieser Energie und zur Emission eines energieärmeren Lichts. Dieses energieärmere Licht ist durch eine bestimmte, größere Wellenlänge gekennzeichnet. Es gibt verschiedene Arten der Fluoreszenz. Primärfluoreszente Stoffe emittieren Licht bei Anregung. Dieses Phänomen ist z.B. bei Chlorophyll zu beobachten. Das Prinzip der Sekundärfluoreszenz basiert auf der Kopplung spezifischer Farbstoffe an die zu untersuchenden Strukturen. Aufgrund unterschiedlicher chemischer Zusammensetzungen und Eigenschaften ermöglichen Farbstoffe eine gezielte Bindung an

bestimmte Strukturen. Der Fluoreszenzfarbstoff Bisbenzimid reichert sich beispielsweise in Adenin- und Thymin-Basenpaaren-reichen Regionen der DNA an. Weitere Beispiele für Fluoreszenzerscheinungen sind die Immunofluoreszenz, die auf einer Anlagerung farbstoffgekoppelter Antikörper basiert oder das natürlich vorkommende grün fluoreszierende Protein, welches von der Qualle *Aequorea victoria* gebildet und von blauem bzw. ultraviolettem Licht zur Fluoreszenz angeregt wird. Durch knock-in kann es genspezifisch an Proteine gebunden und als Biomarker medizinisch nutzbar gemacht werden (Stepanenko et al., 2008).

Die medizinische Anwendung der Fluoreszenz erfolgt in der Epifluoreszenzmikroskopie, einer Sonderform der Auflichtmikroskopie. Das Anregunglicht dieser Mikroskope wird durch die Verwendung von Lasern oder Quecksilberdampflampen erzeugt. Vorteil der Quecksilberdampflampen ist, dass sie Licht aller Wellenlängen emittieren. Spezielle Filter ermöglichen die Reduktion dieses Lichtspektrums auf ausgewählte Wellenlängen (siehe Abb. 2).

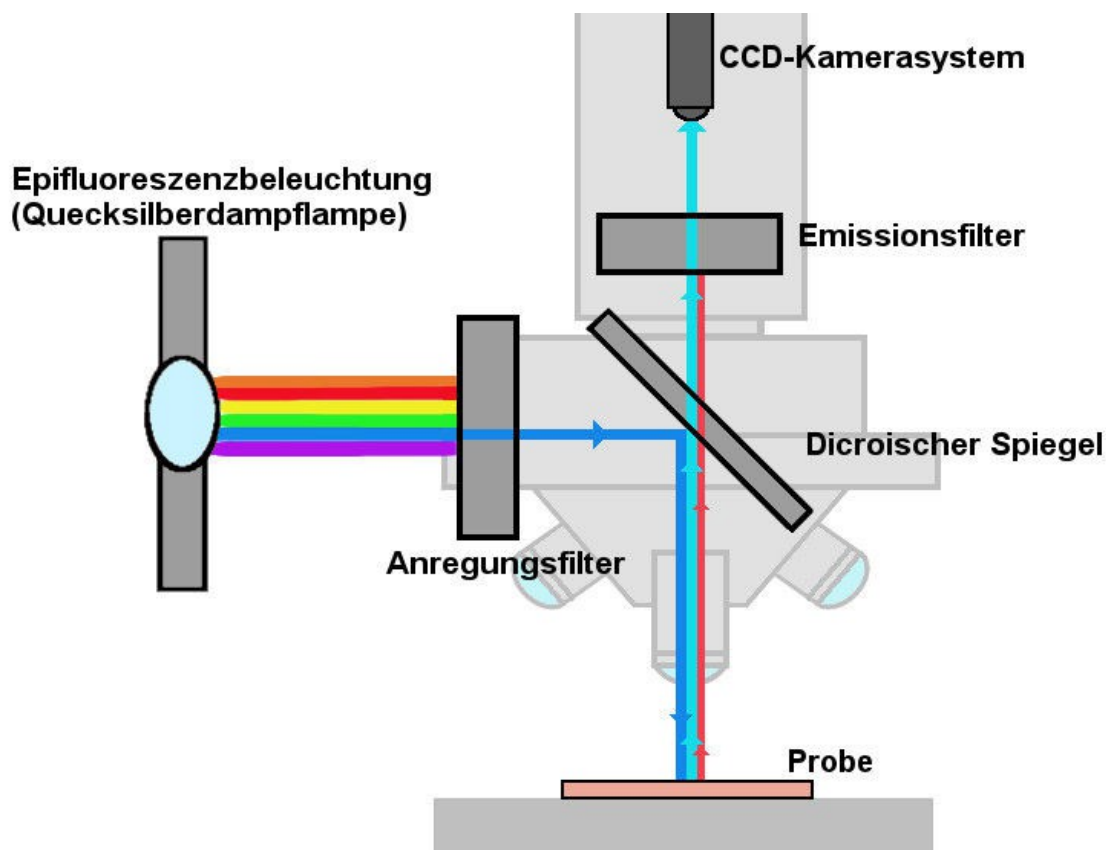


Abb. 2: Schematische Darstellung der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie.

In dieser Studie wurde ein Epifluoreszenzmikroskop von Zeiss verwendet (siehe Abb. 3). Die Erzeugung des Anregungslichtes erfolgte durch eine Quecksilberdampflampe mit einer Leistung

von 100 Watt. Zur Regulierung der Wellenlängen des Anregungslichtes ist das Mikroskop mit Filtern für blaues (Wellenlänge 450 - 490 nm), grünes (530 - 560 nm) und ultraviolettes Licht (330 - 380 nm) ausgestattet (Axiotech vario, Zeiss, Jena). Zur Vergrößerung besitzt es verschiedene Objektive (x20/0.50 W, x40/0.8 W, Zeiss). Das Mikroskop ist durch ein charge-coupled device (CCD) Kamerasystem (FK 6990A-IQ, Pieper, Berlin) an einen Bildschirm (PM-J20, Ikegami Electronics Europe GmbH) sowie an einen VHS-Videorekorder (Fuji magnetic GmbH) gekoppelt, um die erfassten Bilder aufzeichnen und zu einem späteren Zeitpunkt digital auswerten zu können.

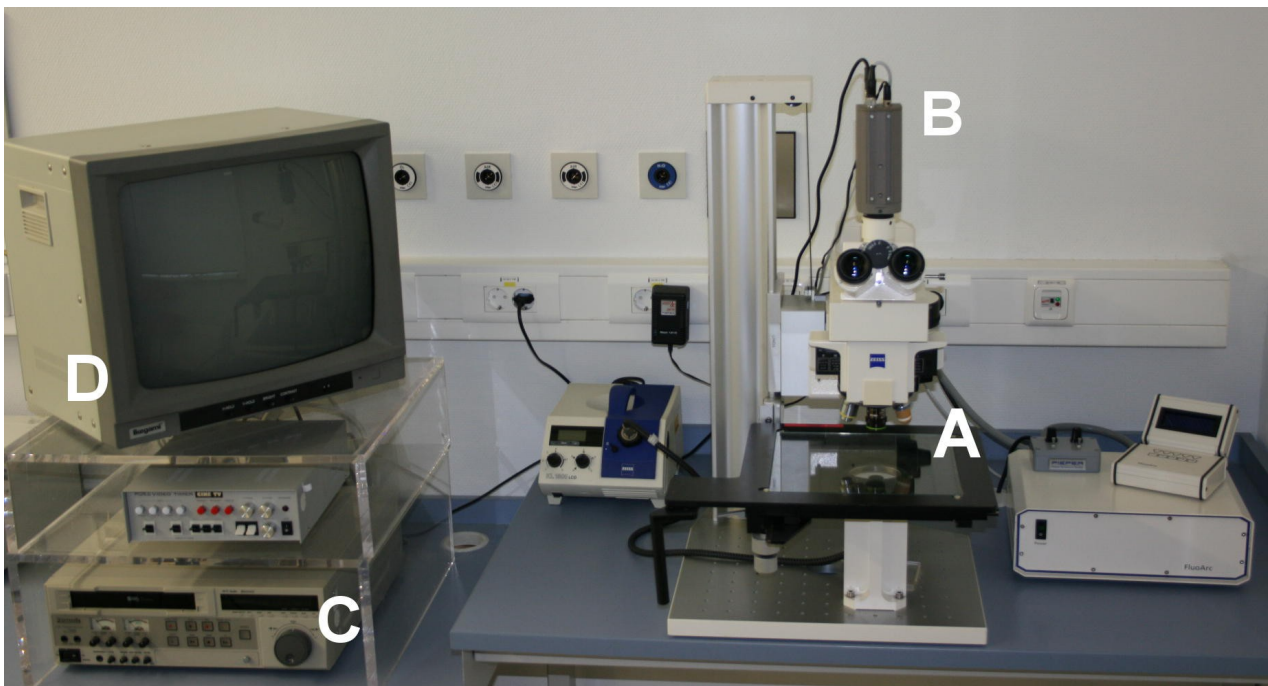


Abb. 3: Versuchsaufbau des intravitalen Fluoreszenzmikroskops. IVM (A), CCD-Kamera System (B), Videorekorder (C), Bildschirm (D).

2.2.1 Fluoreszenzfarbstoffe

Die Intravitalmikroskopie (IVM) der vorliegenden Studie nutzt das Prinzip der Sekundärfluoreszenz. Es kamen drei Farbstoffe zum Einsatz. Der Farbstoff Natriumfluoreszein ($C_2H_{10}Na_2O_5$) ist nach intravenöser Gabe in der Lage, aus dem Intravasalraum durch das fenestrierte Leberendothel in den Extravasalraum zu diffundieren, wo er von Hepatozyten aufgenommen und maßgeblich im perizentralen Gewebe angereichert wird. Das blaue Licht (Wellenlänge 450 - 490 nm), unter dem die Aufnahmen angefertigt wurden, regt die Farbstoff akkumulierenden Hepatozyten zur Emission von Licht an und sorgt für eine Kontrastverstärkung zwischen dem Intra- und Extravasalraum.

Zur Anfärbung der Leukozyten wurde Rhodamin-6G ($C_{28}H_{31}N_2O_3Cl$) verwendet, welches unter dem

Filter von grünem Licht (530 - 560 nm) zur Fluoreszenz angeregt wird. Rhodamin-6G ist ein kationischer Farbstoff, der sich unter physiologischen Bedingungen in Zellkernen und Mitochondrien anreichert (Saetzler et al., 1997).

Der Fluoreszenzfarbstoff Bisbenzimid H33342 ($C_{27}H_{28}N_6O \cdot 3HCl \cdot 3H_2O$) reichert sich in Regionen zahlreicher Adenin- und Thyminbasenpaare in doppelsträngiger DNA an und führt zu einer Anfärbung von Chromatin. Die während Apoptosevorgängen ablaufende Kondensation und Fragmentation genomischer DNA führt somit zu einem verstärkten Signal von Bisbenzimid und einer charakteristischen Fluoreszenz der betroffenen Hepatozyten, so dass sie sich von vitalen Zellen abgrenzen lassen. Bisbenzimid wird unter UV-Licht mit einer Wellenlänge von 330 - 380 nm zur Spontanemission angeregt.

2.3 Modell

2.3.1 Versuchstiere

Bei den Versuchstieren handelte es sich um männliche, 8 - 12 Wochen alte C57BL/6-Mäuse (siehe Abb. 4). Die Mäuse wurden bei einem 12 Stunden Tag-Nacht-Rhythmus in offener Käfighaltung mit Nestbaumaterialien untergebracht und erhielten *ad libitum* Zugang zu Wasser und Futter.

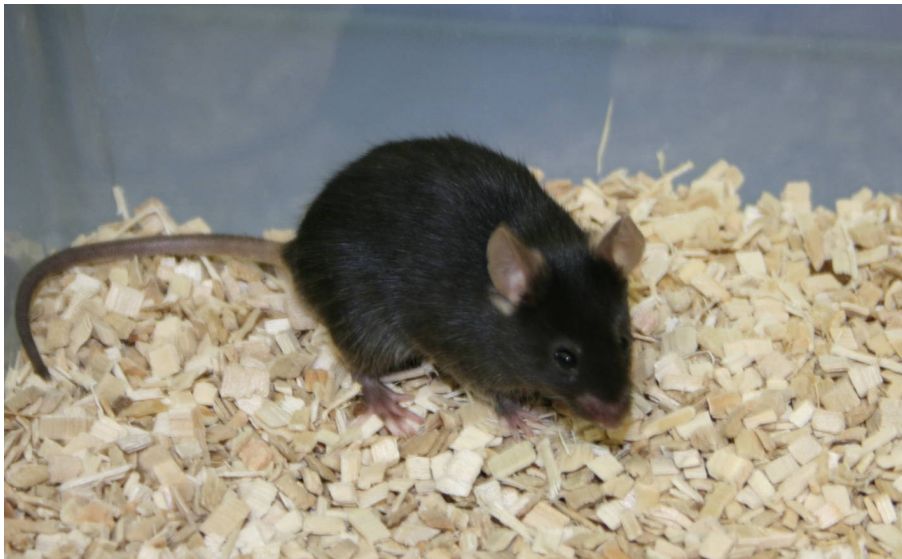


Abb. 4: C57BL/6-Maus.

2.3.2 Endotoxinämie-Modell des ALV

Das ALV wurde bei den Versuchsmäusen mit einer intraperitonealen (i.p.) Gabe einer Kombination aus dem Aminosucker 2-Amino-2-Deoxy-D-Galaktose (D-Galn, 720 mg/kg KG) und LPS (E.coli, 10 µg/kg KG) induziert. LPS ist ein aus Lipid A und Polysacchariden zusammengesetzter Bestandteil der äußeren Zellmembran gram-negativer Bakterien. Die Verabreichung von LPS führt bei Mäusen zur Apoptose in Lymphorganen (Morikawa et al., 1996). Die Bindung von LPS an den aus CD14 und TLR-4 bestehenden Lipopolysaccharidrezeptor, der auf Immunzellen wie Makrophagen und Lymphozyten exprimiert wird, führt zu einer Freisetzung der proinflammatorischen Zytokine TNF- α , IL-1 und IL-6 sowie NO. Mäuse sind um den Faktor 1000 weniger empfindlich für LPS als Menschen (Leist et al., 1995). D-Galn führt bei Verabreichung hoher Dosierungen zu einem fulminanten, Virushepatitis-ähnlichen Krankheitsbild (Keppler et al., 1968). D-Galn wird bevorzugt hepatisch verstoffwechselt (Decker und Keppler, 1974) und induziert einen selektiven Abbau von Uridinnukleotiden in den Hepatozyten, welcher zu einer Transkriptions- und Translationsblockade führt (Anukarahanonta et al., 1973). Bei zeitgleicher Applikation von D-Galn/LPS (G/L) ruft D-Galn eine um den Faktor 10^5 verstärkte Empfindlichkeit gegenüber LPS hervor (Galanos et al., 1979) und führt so zuverlässig zu einem ALV im Tiermodell.

2.3.3 Anästhesie

Die Durchführung der Tierversuche erfolgte unter einer Kombinationsanästhesie aus Ketamin (Ket, 75 mg/kg KG; Betapharm GmbH, Vechta, Deutschland) und Xylazin (Xyl, 25 mg/kg KG; Rompun, Bayer HealthCare, Deutschland), die den Mäusen i.p. verabreicht und deren Aufrechterhaltung während des gesamten Versuchszeitraumes durch Erhaltungsdosen und regelmäßige Reflexprüfung gewährleistet wurde.

2.3.4 Chirurgische Präparation

Im ersten Teilabschnitt der chirurgischen Präparation erfolgte eine intravenöse (i.v.) Injektion in die Vena jugularis externa sinistra zur Vorbehandlung der Tiere mit HEP, DBTC4/Fas siRNA oder DBTC4/Luci siRNA. Vor Beginn des Experimentes wurde den Mäusen gewichtsadaptiert eine Lösung aus Ket/Xyl i.p. zur Narkotisierung injiziert. Nach Eintreten der Narkose wurde das Fell der Tiere an der linken Halsunterseite mittels eines Elektrorasierers entfernt. Um die Körpertemperatur der Mäuse konstant bei ca. 37°C zu halten, wurde die mikrochirurgische Präparation auf einer Heizplatte (Klaus Effenberger, Pfaffing, Deutschland) durchgeführt. Die Lagerung erfolgte in

Rückenlage und in Fixation der Tiere an den Vorder- und Hinterpfoten unter einem Stereo-Operationsmikroskop (Leica M651/M655, Leica Microsystems AG, Schweiz). Nach paratrachealer Längsinzision wurde die Vena jugularis externa sinistra stumpf präpariert. Mit einer Insulinspritze erfolgte die i.v. Applikation von 0,3 ml des Agens (HEP, DBTC4/Fas siRNA oder DBTC4/Luci siRNA) unter verblindet randomisierten Versuchsbedingungen. Der Hautlängsschnitt wurde mit nicht-resorbierbarem 6-0 Prolenefaden vernäht. Anschließend wurden die noch narkotisierten Tiere unter eine Rotlichtlampe verbracht, um sie vor Auskühlung zu schützen. Die Versuchstiere wurden bis zum weiteren Fortgang des Experimentes in der chronischen Tierhaltung untergebracht.

Im zweiten Abschnitt wurden die Versuchsmäuse erneut mit Ket/Xyl adaptiert zum Körpergewicht anästhesiert. Es erfolgte die Rasur des Fells an Bauch und rechter Halsunterseite. Die Tiere wurden auf einer Heizplatte unter einem Stereo-Operationsmikroskop gelagert und fixiert.

Zur Verabreichung von Fluoreszenzfarbstoffen erfolgte die Anlage eines Venenkatheters. Unter Verwendung des Stereo-Operationsmikroskops wurde die Oberhaut des Tieres durch einen paratrachealen Längsschnitt eröffnet, die rechte Vena jugularis externa dextra dargestellt, distal ligiert und zwei weitere Ligaturen (proximal und medial) vorgelegt (Polyester-S grün USP 5/5, nicht resorbierbar). Blut-zuführende venöse Seitenäste wurden thermokoaguliert, um das Hauptgefäß in Blutleere inzidieren zu können. Über die Inzision erfolgte die intraluminale Einführung eines mit 0,9%iger Natriumchloridlösung (NaCl) gespülten Polyethylenkatheters (PE, Innendurchmesser 0,28 mm, Außendurchmesser 0,61 mm). Anschließend wurde der Katheter durch die mediale und proximale Ligatur fixiert.

Die Leberauslagerung begann mit der Laparotomie in der Linea mediana anterior über die gesamte Länge des Abdomens bis zum Processus xiphoideus. Unterhalb und parallel zu den Rippenbögen erfolgten beidseits transversale Schnitte. Durch kraniale Fixation der entstandenen oberen Hautlappen mittels Operationshaken wurde die Zugänglichkeit zum Operationsfeld verbessert. Die Haltebänder, welche die Leber an Magen und Zwerchfell fixierten, wurden zur besseren Mobilisierbarkeit durchtrennt. Der Lobus sinister lateralis der Leber wurde mithilfe NaCl-getränkter Wattestäbchen rotiert, sodass die vormals nach innen zeigende Oberfläche nun nach außen und oben gewandt zu Liegen kam. Dieser Leberlappen wurde auf einem geformten und dem Leberlappen angepassten Plastilinlöffel gelagert, mit einem Deckglas (12 mm Durchmesser) bedeckt und mit NaCl umspült. Das verbliebene, offenliegende Abdomen wurde mit NaCl-getränkten Kompressen bedeckt, um eine Feuchthaltung über den restlichen Versuchszeitraum zu gewährleisten und eine Austrocknung zu verhindern (siehe Abb. 5).



Abb. 5: C57BL/6-Maus nach chirurgischer Präparation und Auslagerung der Leber.

2.4 Untersuchungstechniken

2.4.1 Intravitalmikroskopie der Leber

Nach der chirurgischen Vorbereitung des Versuchstieres wurden intravitalmikroskopische Aufnahmen zur Evaluation der Leberschädigung angefertigt.

Es wurden drei Parameter erhoben, nämlich die Erfassung der hepatischen Mikrozirkulation, der Leukozyten-Endothelzell-Interaktion und der hepatozellulären Apoptose.

Nach Platzierung des Tieres unter dem IVM wurden diesem zunächst 3 Farbstoffe verabreicht - Natriumfluoreszein (2 $\mu\text{mol/kg KG}$; Merck, Darmstadt), 1%iges Rhodamin-6G (1 $\mu\text{mol/kg KG}$; Merck) und Bisbenzimid (Hoechst 33342; 10 $\mu\text{mol/kg KG}$; Sigma-Aldrich). Die Tiere erhielten gewichtsadaptierte Volumina eines jeden Farbstoffes durch den Venenkatheter gefolgt von 0,2 ml NaCl, um die Farbstoffe durch den Katheter in den Blutkreislauf der Tiere zu leiten.

Anschließend wurden 10 Gesichtsfelder (GF) pro Parameter unter dem 20er Objektiv des IVM aufgenommen. Bei einem Gesichtsfeld handelte es sich um den Abschnitt einer Versuchstierleber, welches das Mikroskop bei einer Vergrößerung von 1:200 abbildet.

Zuerst wurde unter dem Blaulichtfilter (Wellenlänge 450 - 490 nm) des IVM die Perfusion der Lebersinusoide aufgenommen. Nachfolgend wurden durch den Grünlichtfilter (530 - 560 nm) zunächst 20 sekundige Sequenzen von postsinusoidalen Venolen angefertigt, um später digital

den Leukozytendurchfluss, das sogenannte 'rolling' und die Leukozytenadhärenz auswerten zu können. Weiterhin wurden Bilder von Lebersinusoiden zur Erfassung der Leukozytenstase aufgenommen. Zuletzt erfolgte der Wechsel zum UV-Filter (330 - 380 nm), um die hepatozelluläre Apoptose in 10 GF zu erfassen.

2.4.1.1 Auswertung der intravitalmikroskopischen Parameter

Die Auswertung der Videoaufnahmen erfolgte am PC mit der Software CaplImage (Zeintl Software, Heidelberg, Deutschland).

2.4.1.2 Hepatische Mikrozirkulation

Bei der Videosequenzauswertung wurde in jedem aufgenommenen GF eine 200 µm lange Gerade senkrecht zum Verlauf der Lebersinusoide gelegt, um 9 bis 12 Sinusoide zu erfassen. Die Beurteilung der Perfusion eines Gefäßes erfolgte anhand der Sichtbarkeit einer regelhaften Durchblutung vor dem Hintergrund Farbstoff-kontrastierten Gewebes (siehe Abb. 6 A). Aus der Anzahl der Sinusoide ohne Zeichen der Perfusion und der Gesamtzahl der Sinusoide wurde anschließend der Perfusionsverlust der untersuchten Leber in % aller Sinusoide berechnet.

2.4.1.3 Leukozyten-Endothelzell-Interaktion

Die Aufnahmen zur Leukozyten-Endothelzell-Interaktion beinhalteten 20 Sekunden lange Sequenzen von postsinusoidalen Venolen. Zunächst wurde der Venolendurchmesser mittels einer Funktion des CaplImage-Programms errechnet und das Gefäß auf einer Länge von 150µm gekennzeichnet, um einen Bereich für die Auszählung der Leukozyten festzulegen. Anschließend wurde deren Blutfluss über einen Zeitraum von zehn Sekunden erfasst. Dabei erfolgte die Auszählung der Leukozyten, die den festgelegten Gefäßabschnitt ungehindert und schnell durchflossen und rollender Leukozyten, welche sich aufgrund beginnender Adhäsionsvorgänge mit dem Endothel deutlich langsamer und ruckartiger bewegten.

Weiterhin wurde die Adhärenz von Leukozyten in den postsinusoidalen Venolen erfasst. Über den berechneten Venolendurchmesser und die festgelegte Gefäßabschnittslänge wurde die Anzahl der adhärenenten Leukozyten in n/mm^2 Endotheloberfläche angegeben (siehe Abb. 6 B).

Desweiteren wurden Aufnahmen von 10 Leberazini ausgewertet, in denen die Anzahl von Leukozyten ausgezählt wurde, die in den Sinusoiden stagnierten. Deren Anzahl wurde in n/mm^2 erfasst.

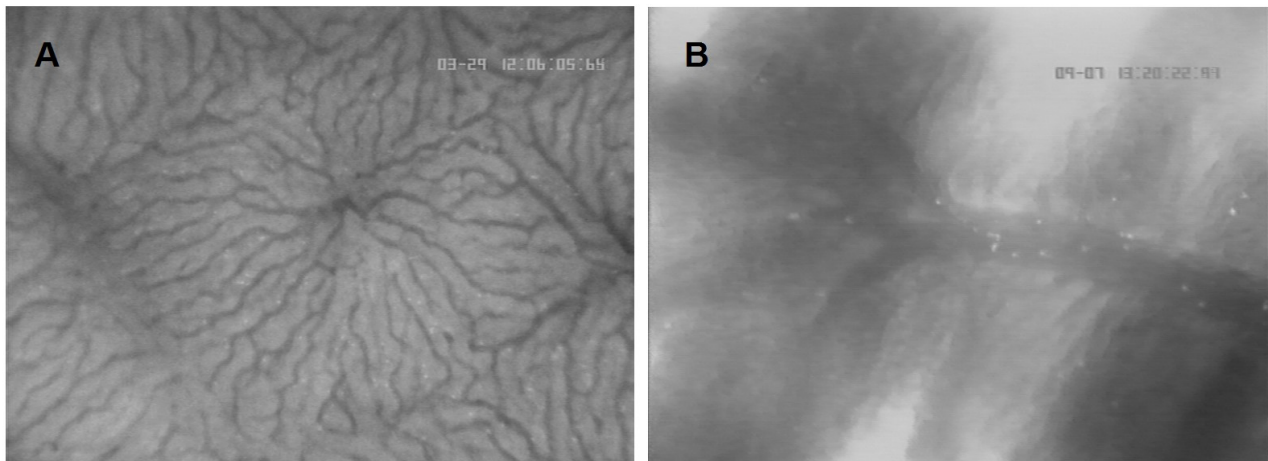


Abb. 6: Intravitalmikroskopische Aufnahmen. Die Abb. **A** zeigt eine Natriumfluoreszin-kontrastierte IVM-Aufnahme der hepatischen Mikrozirkulation. **B** zeigt eine IVM-Aufnahme einer postsinusoidalen Venole. Rhodamin-6G gefärbte Leukozyten imponieren als weiße Punkte.

2.4.1.4 Hepatozelluläre Apoptose

Ein weiterer intravitalmikroskopischer Parameter, der zur Auswertung kam, war die Erfassung der hepatozellulären Apoptose. Apoptotische Hepatozyten wurden anhand ihrer charakteristischen, durch Bisbenzimid hervorgerufenen Intensitätszunahme aufgrund der Kondensation und Fragmentation des Chromatins identifiziert und, bezogen auf die durch ein GF abgebildete Fläche, in der Einheit n/mm^2 angegeben.

2.4.2 Blut- und Gewebeasservierung

Nach Beendigung der IVM wurden die Versuchstiere durch Punktion der Vena cava inferior entblutet. Das gewonnene Material wurde in Ca^{2+} -EDTA-beschichteten Reaktionsgefäßen asserviert. Die Blutproben wurden für 10 Minuten bei 3500 Umdrehungen/Minute (GS15 Zentrifuge, Beckman Coulter GmbH) zentrifugiert. Das Plasma wurde abpipettiert und bei $-20^{\circ}C$ gelagert. Aus diesem Material wurde die Plasmaaktivität der Leberenzyme Alanin-Aminotransferase (ALT), Aspartat-Aminotransferase (AST) und des Akute Phase Proteins IL-6 mittels eines Cobas C111 (Roche, Deutschland) bestimmt.

Zur histologischen und immunhistochemischen Untersuchung wurden Lebergewebeproben entnommen und in phosphatgepuffertem, 4%igen Formalin für mindestens 24 Stunden fixiert. Weitere Proben des Lebergewebes der Versuchstiere wurden in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bei $-80^{\circ}C$ bis zur Analyse aufbewahrt.

2.4.3 Histologie und Immunhistochemie

Zur histologischen Verifizierung der Leberschädigung wurden drei verschiedene Methoden angewandt. Die Beurteilung des Ausmaßes der Nekrose erfolgte durch die Standardfärbung mit Hämatoxylin und Eosin (HE). Die Leukozyteninfiltration des Lebergewebes wurde durch die histochemische Chloracetat-Esterase-Färbung (CAE) dargestellt. Die Anzahl apoptotischer Hepatozyten wurde mittels des immunhistochemischen Nachweises der cleaved Caspase-3 ausgewertet.

2.4.3.1 Hämatoxylin und Eosin

Bei der HE-Färbung handelt es sich um die Standardfärbung in der histologischen Begutachtung (siehe Abb. 7 A). Zur Färbung der Zellkompartimente bedient sich diese Färbemethode elektrostatischer Interaktionen mit Gewebsbestandteilen. Basische Farbstoffe wie Hämatoxylin lagern sich an anionische (negativ geladene) Komponenten wie DNA, RNA oder sulfatierte Glykosaminglykane. Hierbei kommt es zur Anlagerung des Oxidationsproduktes von Hämatoxylin, dem Hämatein, einer Komplexverbindung aus positiv geladenen Metallionen. Dabei kann es sich unter anderem um die Metalle Aluminium, Eisen oder Chrom handeln. Saure Farbstoffe binden an kationische (positiv geladene) Zellbestandteile, wie verschiedene zytoplasmatische Proteine, Mitochondrien, Speicher- und Sekretgranula. Der verbreitetste azidophile Farbstoff ist ein Tetrabromfluorescein ($C_{20}H_6Br_4Na_2O_5$, Eosin Y), ein Xanthenderivat (Lüllmann-Rauch, 2006).

Das asservierte, in 4%igem und phosphatgepuffertem Formalin inkubierte Lebergewebe der Versuchstiere wurde entwässert, in Paraffin eingebettet und mit einem Mikrotom wurden 4 µm dicke Gewebsschnitte angefertigt. Anschließend erfolgte die Entparaffinierung mit einer absteigenden Alkoholreihe, die Färbung mit Hämalun und Eosin und die Konservierung durch eine aufsteigende Alkoholreihe.

Die Auswertung der HE-gefärbten Leberpräparate erfolgte, indem der gesamte Querschnitt eines Präparates mittels eines Lichtmikroskops (Olympus BX 51, Hamburg, Deutschland) und einer Color View II FW Camera (Color View, München, Deutschland) aufgenommen wurde. Mit dem GNU Image Manipulation Program wurden die Areale der Aufnahmen bestimmt, die charakteristische Eigenschaften der Nekrose wie Azidophilie, Zellschwellung, Zellyse und leukozytäre Infiltration aufwiesen und in % der Gesamtoberfläche des Präparats angegeben.

2.4.3.2 Chloracetat-Esterase

Der Färbemechanismus beruht auf der enzymatischen Hydrolyse von Naphthol-AS-D-Chloracetat zu einer Naphtholverbindung, die durch eine Kopplungsreaktion mit einem Diazoniumsalz zu einem charakteristisch rot-violetten Azofarbstoff reagiert. Dieser reichert sich in Korrelation zum Reifungsstadium von PMN an.

Es erfolgte die Herstellung 4 µm dicker Gewebsschnitte, deren Entparaffinierung mittels einer absteigenden Alkoholreihe und Inkubation in einer Färbelösung, die sich aus Pararosanilin, Natriumnitrat, Dimethylformamid, Naphthol-AS-D-Chloracetat und Veronal-Acetat-Puffer zusammensetzte. Anschließend wurden die Schnitte mit Eosin gegengefärbt und mit einer ansteigenden Alkoholreihe konserviert.

Die Auswertung erfolgte in Form einer lichtmikroskopischen Auszählung CAE-positiv gefärbter Zellen innerhalb von 25 GF pro Leberpräparat bei einer 400-fachen Vergrößerung. Die Ergebnisse wurden in der Einheit Zellen pro GF angegeben.

2.4.3.3 Cleaved Caspase-3

Die Caspase-3 ist ein Effektorenzym des apoptotischen Signalwegs, welches immunhistochemisch detektiert werden kann und eine hohe Spezifität als Marker für apoptotische Zellen aufweist. Bei der proteolytischen Aktivierung des Zymogens Pro-Caspase 3 entstehen zwei Fragmente. Der farbstoffgekoppelte Antikörper ist in der Lage, sich an ein Epitop des größeren Fragmentes anzulagern.

Es erfolgte die Herstellung 4 µm dicker Gewebsschnitte, die Entparaffinierung mittels einer absteigenden Alkoholreihe und Inkubation mit einem polyklonalen cleaved Caspase-3 Antikörper (rabbit polyclonal cleaved caspase-3 antibody, 1:500, Cell Signalling Technology, Frankfurt, Deutschland).

Cleaved Caspase-3 positive Zellen stellen sich lichtmikroskopisch als charakteristisch bräunlich eingefärbte Hepatozyten dar (siehe Abb. 7 B). Die Auswertung erfolgte in Form einer Auszählung cleaved Caspase-3 positiv gefärbter Zellen innerhalb von 25 GF pro Leberpräparat bei 400-facher Vergrößerung. Die Ergebnisse wurden in der Einheit Zellen pro GF angegeben.

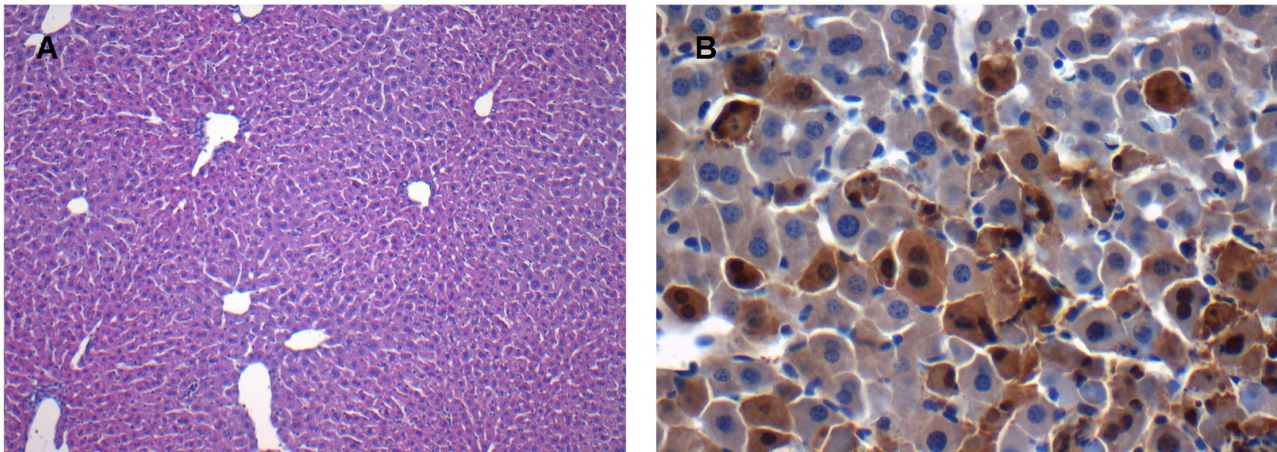


Abb. 7: Histologie. Die Abb. **A** zeigt einen charakteristisch HE gefärbten, histologischen Schnitt von gesundem Lebergewebe eines **NaCl-Tieres** in 100x Vergrößerung. **B** zeigt eine Aufnahme der Immunhistochemie cleaved Caspase-3 eines **ALV-Tieres** (HEP + G/L) in 400x Vergrößerung. Bräunlich angefärbte Hepatozyten befinden sich in Apoptose.

2.5 Versuchskinetik des experimentellen Protokolls

Zu Beginn der Studie wurden Kinetikversuche durchgeführt, um die Wirksamkeit der DBTC4/Fas siRNA zu evaluieren. Zunächst wurden $n = 7$ Versuchstiere mit DBTC4/Fas siRNA und $n = 2$ mit HEP über die linke V. jugularis -24 Stunden vor Induktion des ALV vorbehandelt. Es erfolgte die Induktion des ALV mit G/L bzw. die Kontrollgabe von NaCl. Nach Ablauf von sechs Stunden erfolgten die Präparation, Gewebeentnahme und Euthanasierung der Tiere. Im asservierten Lebergewebe wurde die FasR-mRNA-Expression mittels quantitativer real-time polymerase chain reaction (PCR) und die FasR-Proteinexpression mittels Western-Blot von Silence Therapeutics bestimmt. Da auf Proteinebene keine ausreichende Herabregulierung stattfand, wurden weitere $n = 5$ Versuchstiere mit der DBTC4/Fas siRNA vorbehandelt und nach Ablauf verschiedener Zeitintervalle mit G/L exponiert, um einen geeigneten Applikationszeitpunkt zu ermitteln, und nach 6 Stunden chirurgisch zur Asservierung des Gewebes präpariert und euthanasiert. Die Zeitintervalle betrugen -48, -72 und -96 Stunden. Nach Gewebeasservierung wurde die FasR-mRNA-Expression erneut mittels PCR bestimmt.



Zum Nachweis der Leberspezifität wurde die FasR-mRNA-Expression nach Applikation von HEP, DBTC4/Fas siRNA oder DBTC4/Luci siRNA in Herz, Lunge, Niere und Leber von $n = 12$ Versuchstieren bei einem Vorbehandlungsintervall von -48 h bestimmt.

2.6 Experimentelles Protokoll des Tiermodells

In der folgenden Tabelle ist die Zusammensetzung der sechs Versuchstiergruppen aufgeführt:

Vorbehandlung (- 48 h)	Induktion ALV bzw. Kontrollgabe NaCl	Anzahl Ver- suchstiere	Gruppenbezeichnung	
			Kontrolle	ALV
HEP	NaCl	n = 4	NaCl	G/L
HEP	G/L	n = 10		
DBTC4/Luci siRNA	NaCl	n = 4	DBTC4 siLuci	
DBTC4/Fas siRNA	NaCl	n = 3	DBTC4 siFas	
DBTC4/Luci siRNA	G/L	n = 8		siLuci G/L
DBTC4/Fas siRNA	G/L	n = 8		siFas G/L

Der Versuchsablauf bestand aus zwei Teilabschnitten. Im ersten Versuchsschritt erfolgte die Injektion zur Vorbehandlung der Tiere über die linke Vena jugularis. Dabei handelte es sich um verblindet durchgeführte Injektionen, welche entweder HEP, DBTC4/Luci siRNA oder DBTC4/Fas siRNA enthielten. Der Zeitpunkt zur Vorbehandlung der Tiere erfolgte 48 Stunden vor Induktion des ALV.

Im zweiten Versuchsschritt wurde den Versuchstieren, zum Zeitpunkt Null, verblindet 0,9%ige NaCl i.p. oder G/L zur Induktion des ALV appliziert. Fünf Stunden später erfolgte die chirurgische Präparation, gefolgt von der IVM und der finalen Gewebsasservierung.



2.7 Überlebensversuch

Zur Erfassung der Letalität des akuten Leberversagens mit und ohne therapeutische Intervention wurde ein Überlebensversuch mit 20 Versuchstieren durchgeführt. Eine Gruppe von n = 10 Tieren wurde mit DBTC4/Fas siRNA und eine weitere Gruppe von n = 10 Tieren mit HEP 48 Stunden vor der Verabreichung von G/L vorbehandelt. Zum Zeitpunkt Null erhielten alle Tiere gewichtsadaptiert G/L i.p. Mit dem Zeitpunkt Null begann die Beobachtungsphase, in welcher die Käfige regelmäßig auf das Versterben der Versuchstiere kontrolliert wurden. Innerhalb der ersten 12 Stunden erfolgten die Kontrollen alle 30 Minuten, danach alle vier Stunden. Verstorbene Tiere wurden entfernt und chirurgisch zur Blut- und Gewebeentnahme für histologische und immun-histochemische Untersuchungen präpariert. Der Beobachtungszeitraum erstreckte sich über 48

Stunden. Versuchstiere, die nach diesem Zeitraum noch am Leben waren, galten als Überlebende.

3 Statistik

Die Versuche erfolgten verblindet. Eine Zuordnung der Versuchstiere zu den verschiedenen Versuchsgruppen und die Auswertung der Versuchsergebnisse erfolgten nach Abschluss der Experimente.

Die intravitalmikroskopisch, histologisch und immunhistochemisch erhobenen Parameter wurden zur elektronischen Datenverarbeitung in OpenOffice.org.3.4.1 bzw. Microsoft Excel übertragen, um Mittelwerte, Standardabweichungen und Standardfehler der Mittelwerte (SEM) zu errechnen. Die statistischen Analysen erfolgten mit dem Programm SigmaStat 3.5 (Jandel Scientific, San Rafael). Die Normalverteilung wurde durch den Kolmogorow-Smirnow-Test überprüft. Zu Gruppenvergleichen wurde die einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) mit Paarvergleich herangezogen. Ein Unterschied wurde als statistisch signifikant gewertet, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit weniger als fünf Prozent betrug ($p < 0,05$). Die dargestellten Diagramme wurden mit der Software SigmaPlot 9.0 (Jandel Corp., San Rafael) erstellt.

4 Ergebnisse

4.1 Versuchskinetik und Zielfindung des experimentellen Protokolls

Die Western-Blotanalyse stellt die FasR-Expression eines NaCl-, G/L-Tieres und von sieben DBTC4/Fas siRNA + G/L-Tieren dar (siehe Abb. 8). Die DBTC4/Fas siRNA + G/L-Gruppe erhielt ihre Vorbehandlung 24 Stunden vor G/L-Exposition. Die Ergebnisse zeigten die Expression des FasR in der Kontrollmaus und die verstärkte Expression des Rezeptors nach G/L-Exposition. Die DBTC4/Fas siRNA behandelten Tiere zeigten eine geringere Expression des FasR gegenüber der Expression in der G/L-Maus. Die hepatozelluläre Apoptose, sichtbar an der Expression von Poly(ADP-ribose)-Polymerase (PARP) und cleaved Caspase-3 wurde jedoch nicht bei allen Tieren nach siRNA-Gabe vollständig inhibiert.

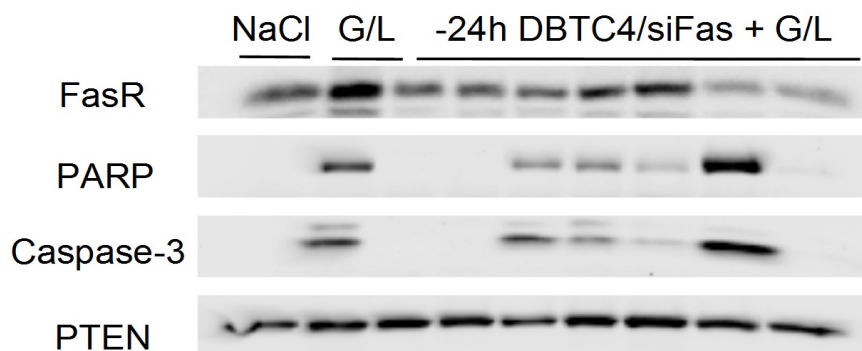


Abb. 8: Ergebnisse der Western-Blotanalytik. Dargestellt ist die Expression des **FasR**, **PARP** und der cleaved Caspase-3 (**Caspase-3**) in einem Kontrolltier (HEP + **NaCl**), einem ALV-Tier (HEP + **G/L**) und sieben **DBTC4/Fas siRNA + G/L-Tieren**, welche die Vorbehandlung mit DBTC4/Fas siRNA 24 Stunden vor G/L-Exposition erhielten. PARP ist ein Enzym zur Reparatur der DNA und lässt in Zusammenschau mit der Caspaseaktivität Rückschlüsse auf das Ausmaß der Apoptose zu. Phosphatase und Tensin homolog (**PTEN**) diente als Ladekontrolle.

Um nicht nur auf Proteinebene, sondern um das silencing der FasR-Expression auch auf mRNA-Ebene zu untersuchen, wurde eine PCR durchgeführt, deren Ergebnisse in Abb. 9 dargestellt sind. Hierbei zeigte sich, dass eine G/L-Exposition zur Verdopplung der FasR-Expression führte, welche durch die DBTC4/Fas siRNA um 60% reduziert wurde und das Niveau der Kontrolltiere (NaCl) erreichte. Die FasR-mRNA wird demnach herabreguliert, allerdings besteht noch eine geringe Rezeptorexpression auf Proteinebene der Hepatozyten (siehe Abb. 8).

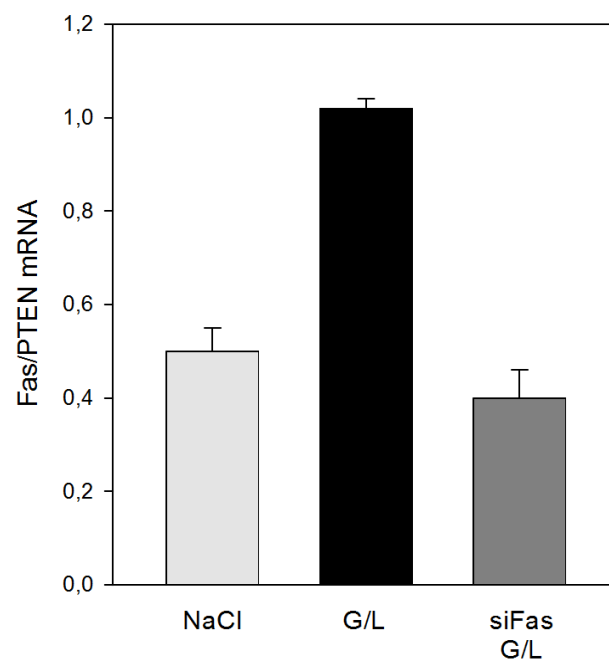


Abb. 9: PCR der FasR-mRNA-Expression bei -24 Vorbehandlung. Dargestellt ist die Vorbehandlung mit HEP und Applikation von NaCl oder G/L bzw. bei Vorbehandlung mit DBTC4/Fas siRNA und Exposition gegenüber G/L. Versuchsgruppen: **NaCl** (HEP + NaCl), **G/L** (HEP + G/L), **siFas G/L** (DBTC4/Fas siRNA + G/L). Das Zeitintervall zwischen Vorbehandlung und Exposition betrug -24h.

Die Exposition mit G/L führt zu einer Verdopplung der FasR-mRNA gegenüber dem Kontrolltier (**NaCl**). Die Vorbehandlung mit DBTC4/Fas siRNA führt zu einer 60% Reduktion der FasR-mRNA im Lebergewebe gegenüber dem **G/L-Tier**. Die Daten sind als Mittelwerte \pm SEM angegeben, $n = 9$. ANOVA mit anschließendem Paarvergleich zeigte keine Signifikanz.

Da auf Proteinebene keine ausreichende Herabregulierung von FasR erfolgte, wurden Kinetikuntersuchungen zur Feststellung eines geeigneten Vorbehandlungszeitpunktes durchgeführt. Bei Ablauf von 24 Stunden zwischen Vorbehandlung mit DBTC4/Fas siRNA und Exposition gegenüber G/L war eine 60%ige Reduktion der FasR-mRNA gegenüber dem ALV-Tier (G/L) zu verzeichnen. Die Tiere ($n = 5$), deren Vorbehandlung mit DBTC4/Fas siRNA 48, 72 oder 96 Stunden vor ALV-Induktion stattfand, zeigten eine noch deutlichere Reduktion der FasR-mRNA um bis zu 90%. Diese Ergebnisse des Kinetikversuches zeigten einen Vorteil in Bezug auf die Herabregulation des FasR bei einem längeren Zeitintervall zwischen Vorbehandlung und Induktion des ALV (siehe Abb. 10). Bereits ein Zeitintervall von 48 Stunden führte zu einer reduzierten Expression der FasR-mRNA um 90% im Vergleich zum ALV-Tier (G/L). Demnach wurde der Zeitabstand für die Vorbehandlung mit DBTC4/Fas siRNA in der vorliegenden Studie auf 48 Stunden festgelegt.

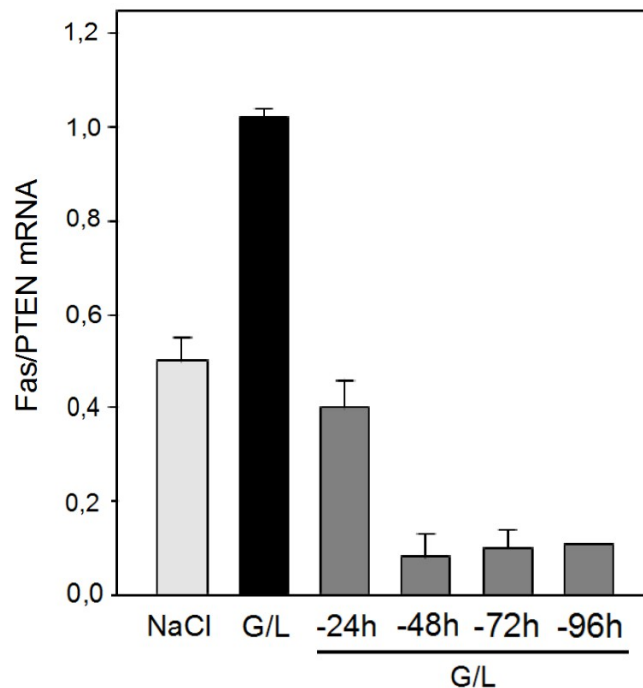


Abb. 10: PCR der FasR-mRNA-Expression bei unterschiedlichen Vorbehandlungszeitpunkten.

Dargestellt ist die **mRNA-Expression** von FasR bei Vorbehandlung mit HEP und Applikation von NaCl oder G/L und bei Vorbehandlung mit DBTC4/Fas siRNA -96, -72, -48 und -24 h vor G/L-Exposition und Gewebeentnahme. Versuchsgruppen: **NaCl** (HEP + NaCl), **G/L** (HEP + G/L), **siFas G/L** (DBTC4/Fas siRNA + G/L). Die Daten sind als Mittelwerte \pm SEM angegeben, $n = 14$. Die Exposition mit G/L führte zu einer Verdopplung der FasR-mRNA-Expression gegenüber NaCl. Die Vorbehandlung mit DBTC4/Fas siRNA -24h vor ALV führt zu einer 60% Reduktion der FasR-mRNA im Lebergewebe gegenüber der ALV-Gruppe (G/L). Eine DBTC4/Fas siRNA-Applikation, die mindestens -48h vor G/L-Exposition stattfand, führte zu einer 90% Reduktion der FasR-mRNA.

Desweiteren erfolgte die Bestimmung der Leberspezifität der verwendeten DBTC4/Fas siRNA. Dazu wurde die mRNA-Expression von FasR in Leber, Lunge, Herz und Niere des asservierten Gewebes von $n = 12$ Tieren bei -48h mittels PCR bestimmt. Hier zeigte sich eine signifikante Reduzierung der FasR-mRNA-Expression in der Leber um 60% im Vergleich zu den Kontrolltieren (NaCl), während die FasR-mRNA-Expression in Herz, Lunge und Niere nicht verändert wurde. Dies weist nach, dass die Lipoplexe der DBTC4/Fas siRNA spezifisch von Hepatozyten aufgenommen werden und somit die hepatische FasR-Expression herabreguliert werden kann, ohne dass eine wesentliche Beeinflussung der FasR-Expression in anderen wichtigen Organen stattfindet. Die Ergebnisse sind in einem Diagramm in Abb. 11 dargestellt.

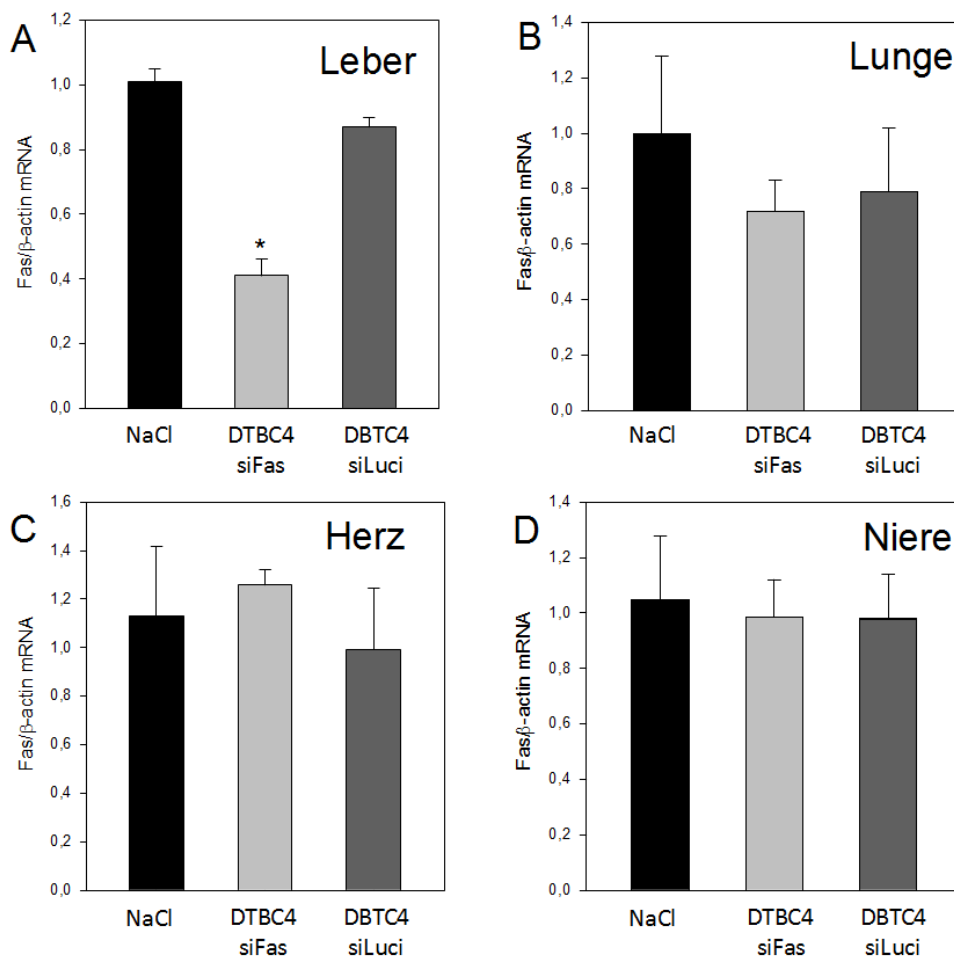


Abb. 11: Quantitative PCR-Analyse der Fas-mRNA-Expression in (A) Leber, (B) Lunge, (C) Herz und (D) Niere. Bestimmung der mRNA-Expression indirekt über die quantitative Bestimmung von Fas/ β -actin mRNA. Die Daten sind als Mittelwerte \pm SEM angegeben, $n = 12$. ANOVA mit anschließendem Paarvergleich (* $p < 0,05$ vs. NaCl). Versuchsgruppen: **NaCl** (HEP + NaCl), **DTBC4 siLuci** (DTBC4/Luci siRNA + NaCl), **DTBC4 siFas** (DTBC4/Fas siRNA + NaCl).

4.2 IVM

4.2.1 Hepatische Mikrozirkulation

Die Kontrollgruppen (NaCl, DTBC4siLuci und DTBC4siFas) zeigten sehr geringe Perfusionsausfälle von maximal 4,5% der Sinusoide, wohingegen die Induktion eines ALV (G/L und siLuci + G/L) zu signifikanten Perfusionsausfällen der sinusoidalen Mikrozirkulation von 72% führte. Dies entspricht einem 16-fach erhöhten Perfusionsverlust im Vergleich zu den Kontrollen. Die Vorbehandlung mit DTBC4/Fas siRNA zeigte eine signifikante Reduktion der Perfusionsausfälle im ALV um 58% auf 14%. In Abb. 12 sind diese Ergebnisse in einem Diagramm dargestellt und in Abb. 13 sind repräsentative IVM-Aufnahmen der Versuchstiere gezeigt.

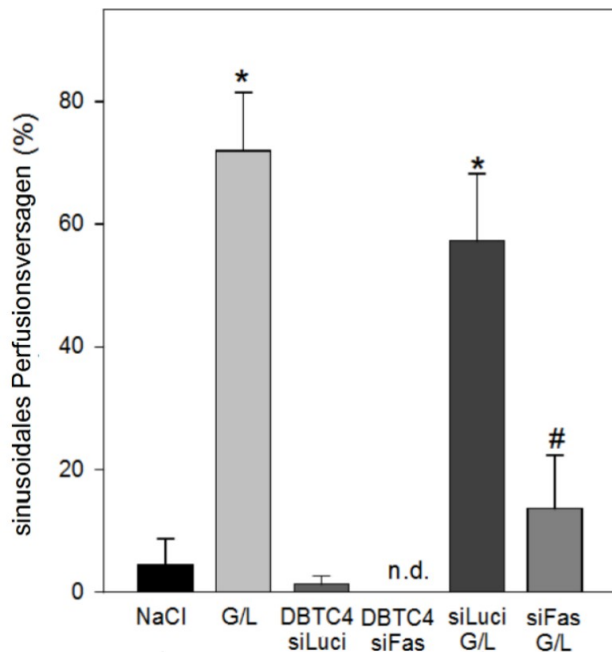


Abb. 12: Quantitative Analyse des hepatischen sinusoidalen Perfusionsversagens. Die Angabe des Perfusionsverlustes in %. Die Daten sind als Mittelwerte \pm SEM angegeben, $n = 37$. ANOVA mit anschließendem Paarvergleich (* $p < 0,05$ vs. NaCl; # $p < 0,05$ vs. G/L). Versuchsgruppen: **NaCl** (HEP + NaCl), **G/L** (HEP + G/L), **DBTC4 siLuci** (DBTC4/Luci siRNA + NaCl), **DBTC4 siFas** (DBTC4/Fas siRNA + NaCl), **siLuci G/L** (DBTC4/Luci siRNA + G/L), **siFas G/L** (DBTC4/Fas siRNA + G/L).

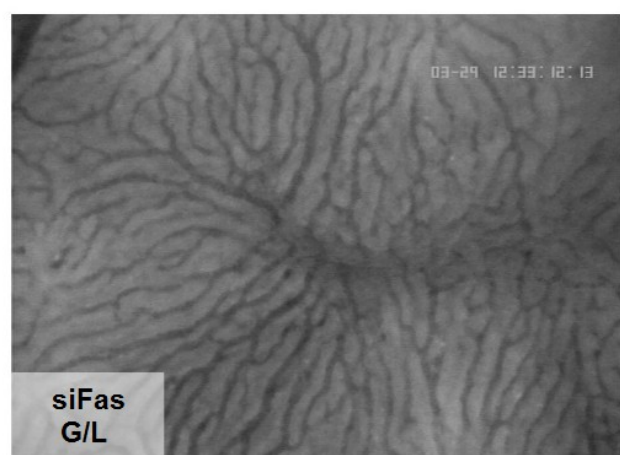
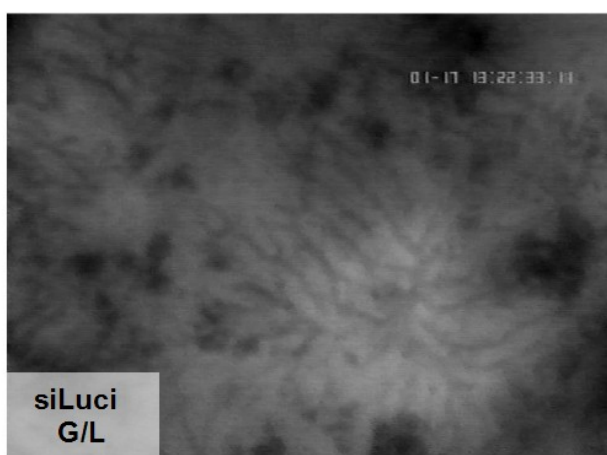
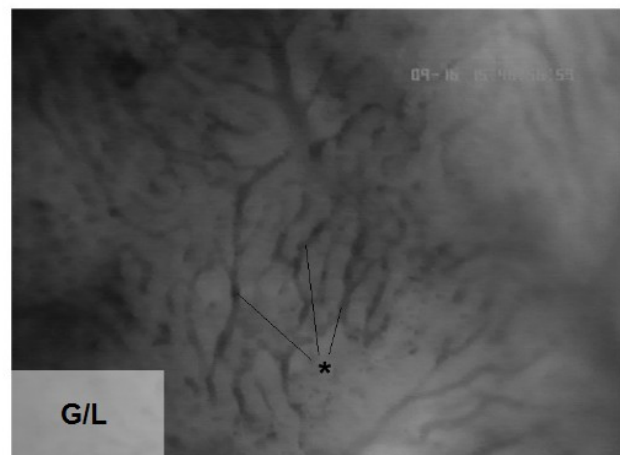
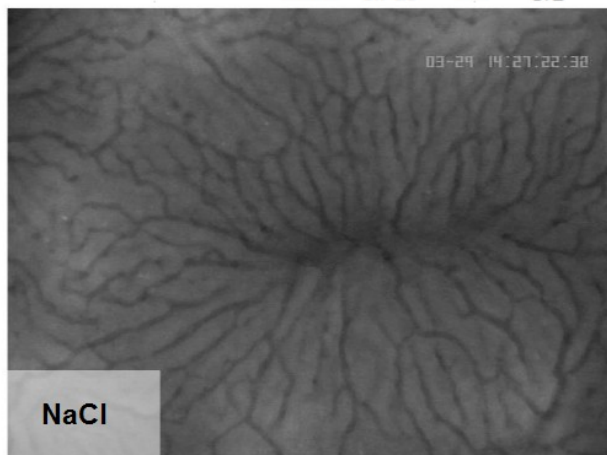


Abb. 13: IVM-Aufnahmen der hepatischen sinusoidalen Mikrozirkulation. Dargestellt sind repräsentative Aufnahmen der Gruppen **NaCl** (HEP + NaCl), **G/L** (HEP + G/L), **siLuci + G/L** (DBTC4/Luci siRNA + G/L), **siFas + G/L** (DBTC4/Fas siRNA + G/L) mit dem Perfusionsverlust (*) einzelner Sinusoide. Die dunklen Areale stellen in Folge der gestörten Perfusion nicht kontrastierte Bereiche der Leber dar.

4.2.2 Leukozyten-Endothelzell-Interaktion

4.2.2.1 Venuläres Leukozytenrollen

Das venuläre Leukozytenrollen gibt den prozentualen Anteil rollender Leukozyten an allen Rhodamin-6G gefärbten Leukozyten, die pro Zeiteinheit die Venole passierten, an. Das venuläre Leukozytenrollen belief sich in den Kontrollgruppen (NaCl, DBTC4siLuci und DBTC4siFas) auf einen sehr geringen Anteil rollender Leukozyten von maximal 6,4%. Die Induktion eines ALV (G/L und siLuci + G/L) resultierte in einem signifikanten 10-fach erhöhten Anteil der rollenden Leukozyten von 65%. Die Vorbehandlung mit DBTC4/Fas siRNA zeigte eine Reduktion der rollenden Leukozyten um 52%. Die Ergebnisse sind in einem Diagramm in Abb. 14 dargestellt.

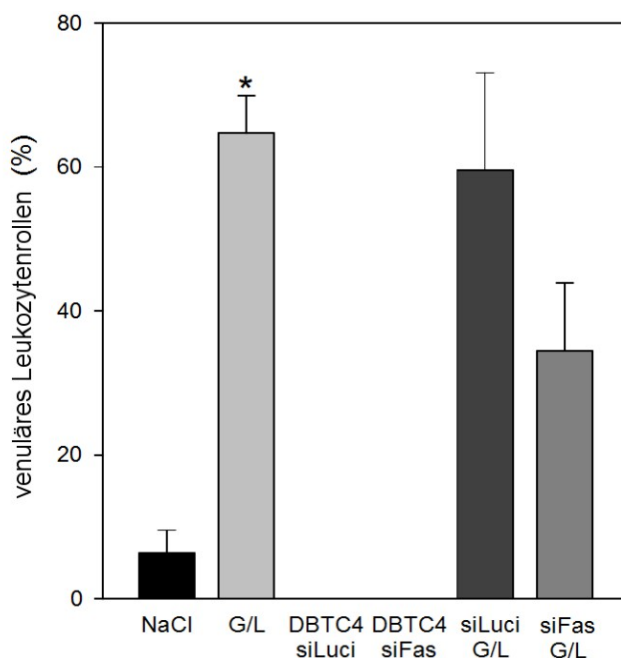


Abb. 14: Quantitative Analyse der Leukozyten-Endothelzell-Interaktion. Das Diagramm zeigt die Ergebnisse des venulären Leukozytenrollens. Das venuläre Leukozytenrollen gibt den prozentualen Anteil rollender Leukozyten an allen Rhodamin-6G gefärbten Leukozyten, die pro Zeiteinheit die Venole passierten, an.

4.2.2.2 Venuläre Leukozytenadhärenz

Die Kontrollgruppen (NaCl, DBTC4siLuci und DBTC4siFas) zeigten mit bis zu 16 Leukozyten pro mm^2 eine sehr geringe Anzahl adhärenter Leukozyten in den postsinusoidalen Venolen. Im Vergleich dazu führte die Induktion eines ALV (G/L und siLuci + G/L) zu einer signifikanten Erhöhung der postsinusoidal adhärenter Leukozyten von 93 - 210 pro mm^2 , welche durch eine Vorbehandlung mit DBTC4/Fas siRNA um 74% auf 54 pro mm^2 reduziert werden konnte. Die Ergebnisse sind in einem Diagramm in Abb. 15 dargestellt. Abb. 16 zeigt repräsentative IVM-Aufnahmen der Leukozytenadhärenz in den postsinusoidalen Venolen.

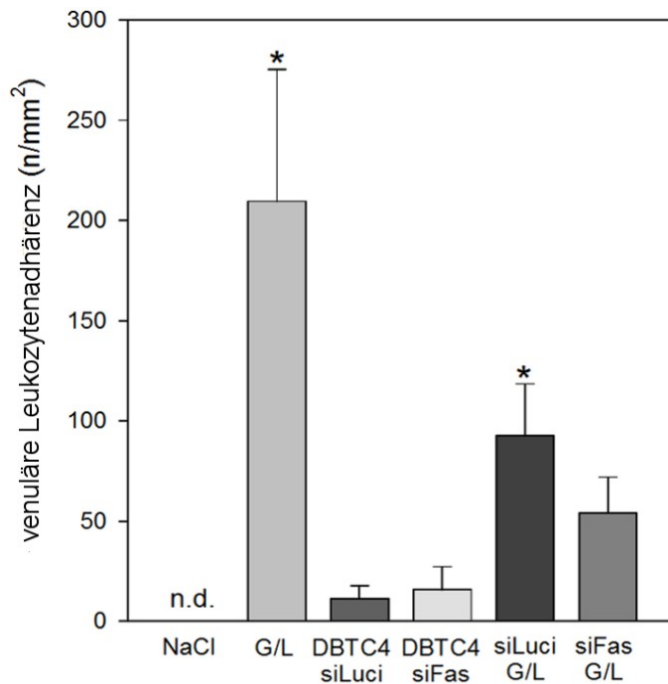


Abb. 15: Quantitative Analyse der Leukozyten-Endothelzell-Interaktion. Das Diagramm stellt die Resultate der venulären Leukozytenadhärenz in n/mm² dar. Die Daten sind als Mittelwerte \pm SEM angegeben, n = 37. ANOVA mit anschließendem Paarvergleich (* p < 0,05 vs. **NaCl**). Versuchsgruppen: **NaCl** (HEP + NaCl), **G/L** (HEP + G/L), **DBTC4 siLuci** (DBTC4/Luci siRNA + NaCl), **DBTC4 siFas** (DBTC4/Fas siRNA + NaCl), **siLuci G/L** (DBTC4/Luci siRNA + G/L), **siFas G/L** (DBTC4/Fas siRNA + G/L).

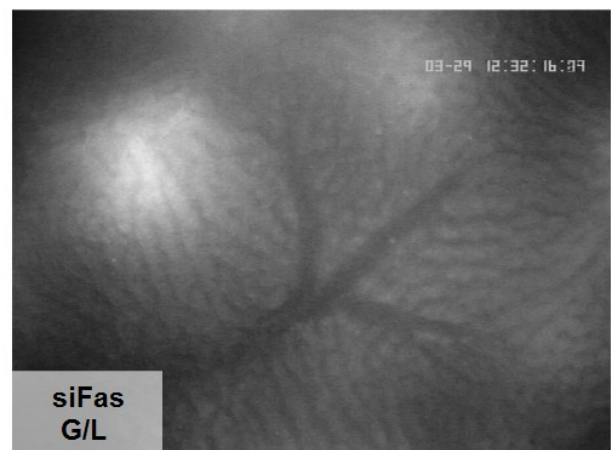
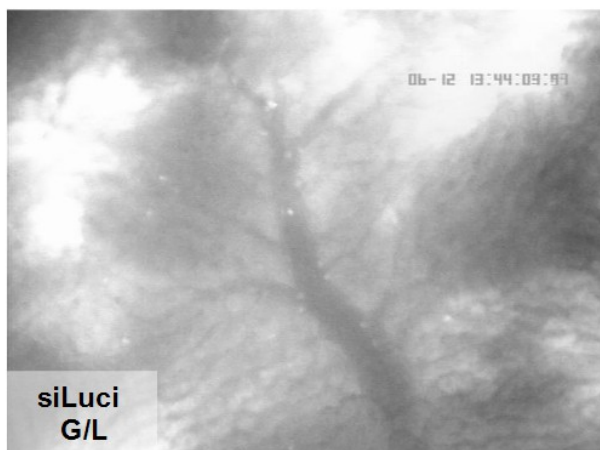
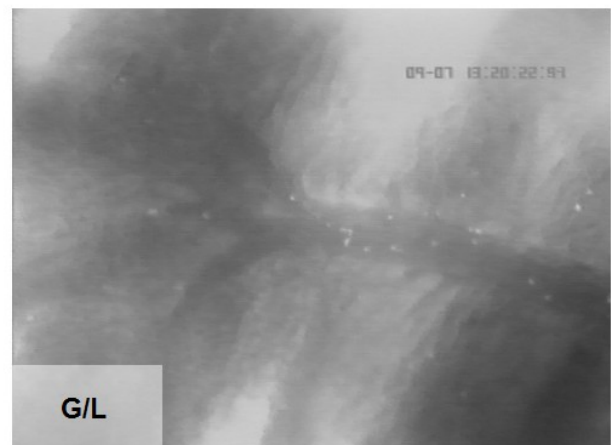
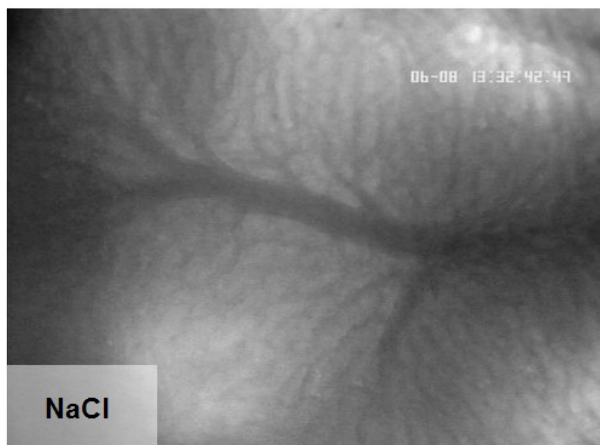


Abb. 16: IVM-Aufnahmen der Leukozyten-Endothelzell-Interaktion. Dargestellt sind repräsentative Aufnahmen der venulären Leukozytenadhärenz in den Gruppen **NaCl** (HEP + NaCl), **G/L** (HEP + G/L), **siLuci + G/L** (DBTC4/Luci siRNA + G/L), **siFas + G/L** (DBTC4/Fas siRNA + G/L). Die Rhodamin-6G

gefärbten Leukozyten imponieren als weiße Punkte, die in den Abbildungen hauptsächlich in den postsinusoidalen Venolen lokalisiert sind. In der **NaCl**-Gruppe zeigen sich keine Leukozyten. Die IVM-Aufnahmen der **G/L**- und **siLuci + G/L**-Gruppen zeigen postsinusoidale Venolen, in denen inflammationsbedingt zahlreiche Leukozyten am Endothel adhären.

4.2.2.3 Sinusoidale Leukozytenstase

Neben der Interaktion von Leukozyten und Endothel in den postsinusoidalen Venolen dient die sinusoidale Leukozytenstase als weiterer Parameter zur Einschätzung der Immunreaktion.

Die Kontrolltiere (NaCl, DBTC4siLuci und DBTC4siFas) wiesen 10 - 16 adhären Leukozyten pro mm² auf. Demgegenüber zeigte die ALV-Gruppe (G/L) eine Verdreifachung des Wertes auf ~25 pro mm², während die Therapie-Gruppe (siFas + G/L) mit <7 pro mm² die geringste Anzahl sinusoidal adhären Leukozyten aufwies. Dies entspricht einer signifikanten Reduzierung der Leukozytenanzahl im Vergleich zur G/L-Gruppe um 72%. Abb. 17 zeigt die Ergebnisse in einem Diagramm und in Abb. 18 sind repräsentative IVM-Aufnahmen dargestellt.

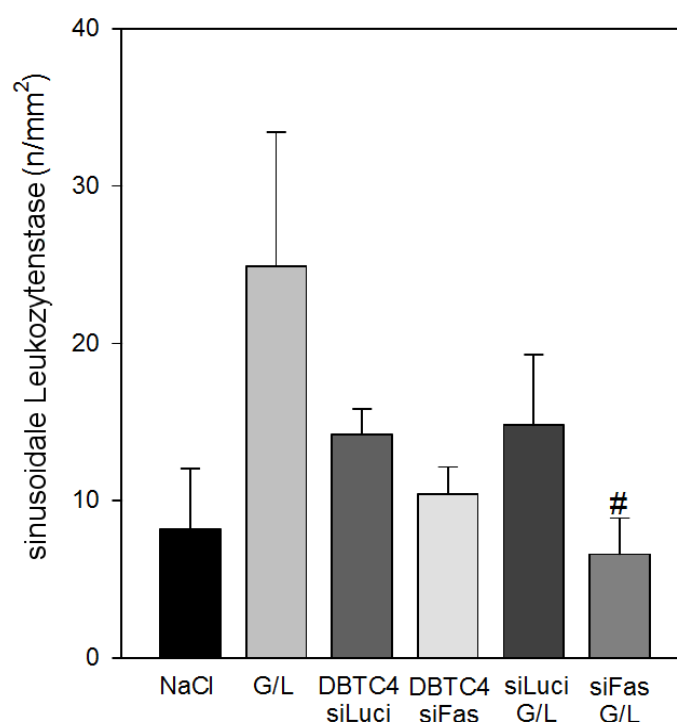


Abb. 17: Quantitative Analyse des sinusoidalen Leukozytenstase. Das Diagramm zeigt die Ergebnisse in n/mm². Die Daten sind als Mittelwerte \pm SEM angegeben, n = 37. ANOVA mit anschließendem Paarvergleich (# p < 0,05 vs. G/L). Versuchsgruppen: **NaCl** (HEP + NaCl), **G/L** (HEP + G/L), **DBTC4 siLuci** (DBTC4/Luci siRNA + NaCl), **DBTC4 siFas** (DBTC4/Fas siRNA + NaCl), **siLuci G/L** (DBTC4/Luci siRNA + G/L), **siFas G/L** (DBTC4/Fas siRNA + G/L).

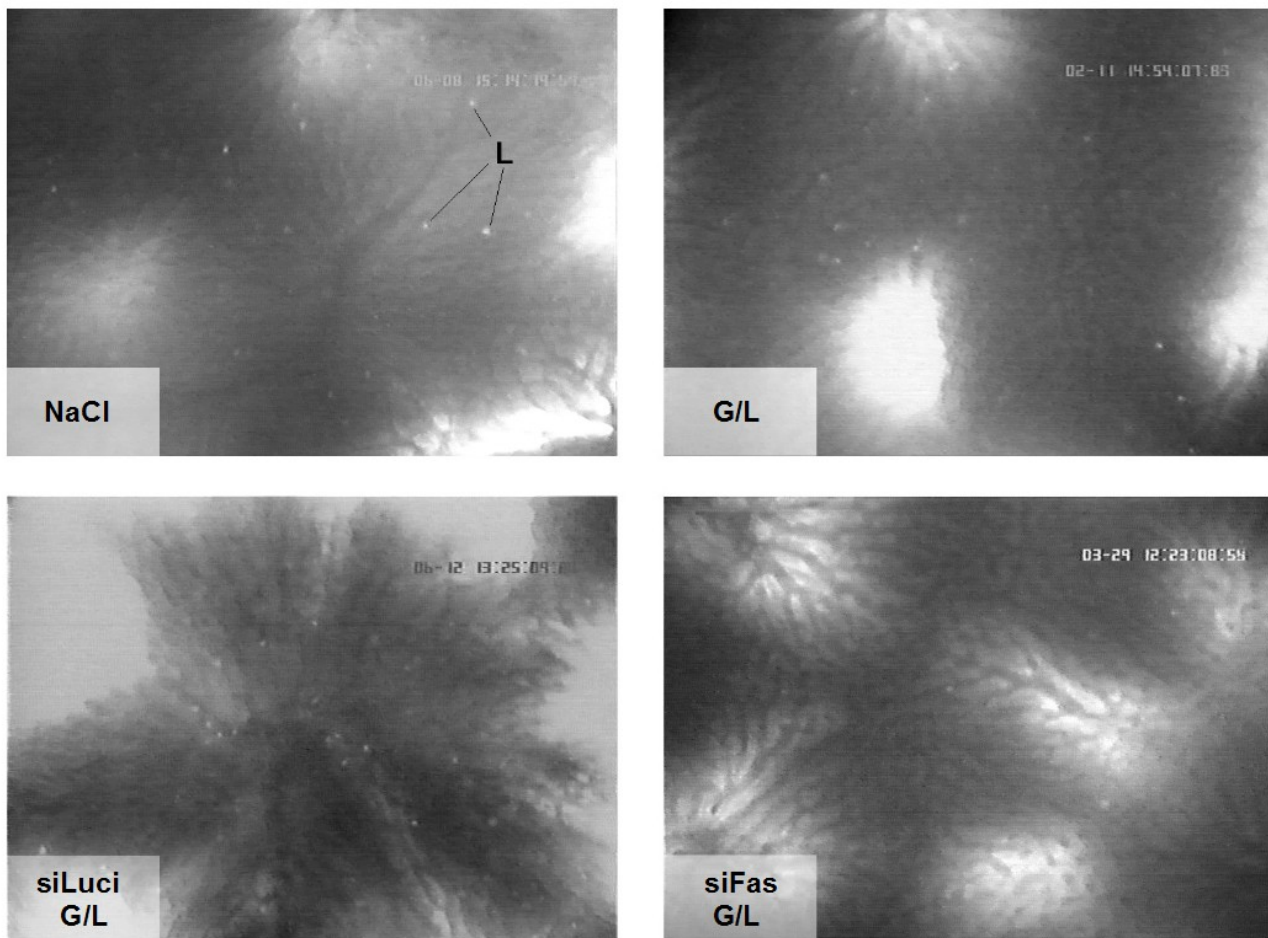


Abb. 18: IVM-Aufnahmen der Leukozyten-Endothelzell-Interaktion. Dargestellt sind repräsentative Aufnahmen der sinusoidalen Leukozytenstase in den Gruppen **NaCl** (HEP + NaCl), **G/L** (HEP + G/L), **siLuci + G/L** (DBTC4/Luci siRNA + G/L), **siFas + G/L** (DBTC4/Fas siRNA + G/L). Die Rhodamin-6G gefärbten Leukozyten imponieren als weiße Punkte (L), die in den hepatischen Sinusoiden stagnieren.

4.2.3 Hepatozelluläre Apoptose

In den Kontrollgruppen (NaCl, DBTC4siLuci und DBTC4siFas) zeigten sich 8 - 25 Apoptosen pro mm². Die Induktion eines ALV (G/L und siLuci + G/L) resultierte in einer massiven hepatozellulären Apoptose. Die Anzahl apoptotischer Hepatozyten war dabei signifikant auf 157 pro mm² erhöht. Dies entspricht einer 33-fach erhöhten Apoptose im Vergleich zu den Kontrollen. Die Vorbehandlung mit DBTC4/Fas siRNA zeigte eine signifikante Reduktion der hepatozellulären Apoptose im ALV um 75% im Vergleich zu den G/L-Gruppen. Abb. 19 zeigt die Ergebnisse in einem Diagramm und in Abb. 20 sind repräsentative IVM-Aufnahmen dargestellt.

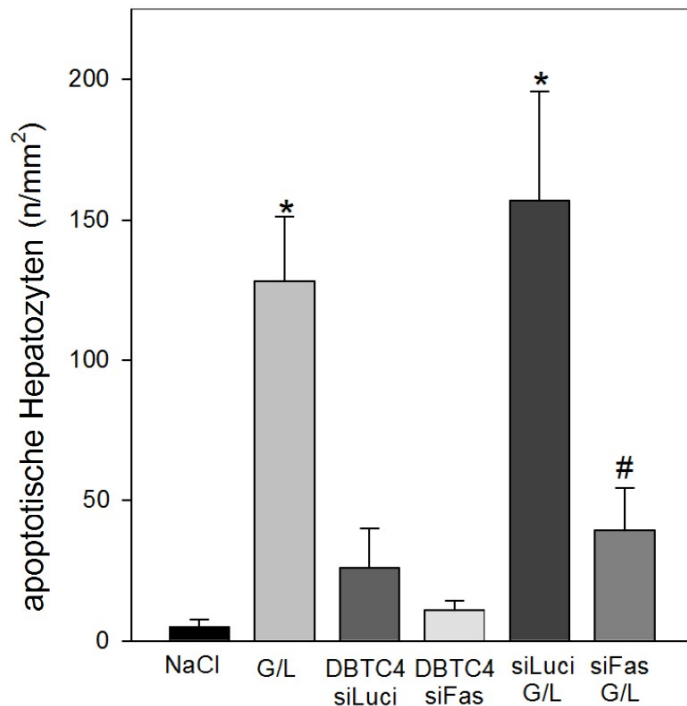


Abb. 19: Quantitative Analyse der Apoptose.

Das Diagramm zeigt die Ergebnisse der Erhebung der hepatozellulären Apoptose in n/mm². Die Daten sind als Mittelwerte \pm SEM angegeben, $n = 37$. ANOVA mit anschließendem Paarvergleich (* $p < 0,05$ vs. NaCl, # $p < 0,05$ vs. G/L). Versuchsgruppen: **NaCl** (HEP + NaCl), **G/L** (HEP + G/L), **DBTC4 siLuci** (DBTC4/Luci siRNA + NaCl), **DBTC4 siFas** (DBTC4/Fas siRNA + NaCl), **siLuci G/L** (DBTC4/Luci siRNA + G/L), **siFas G/L** (DBTC4/Fas siRNA + G/L).

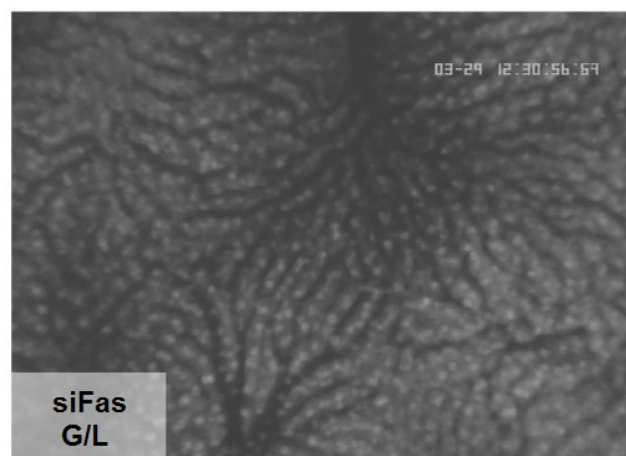
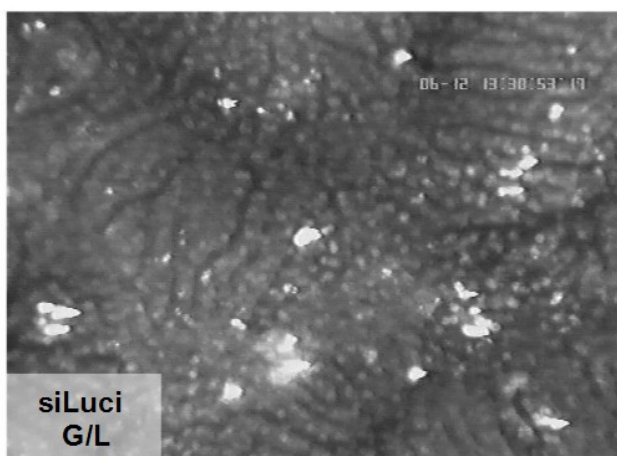
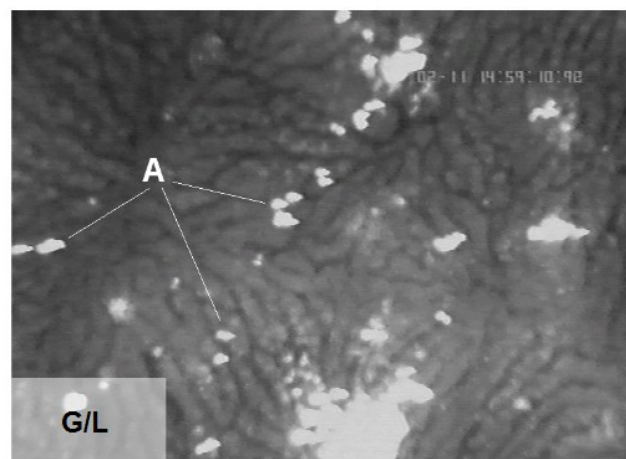
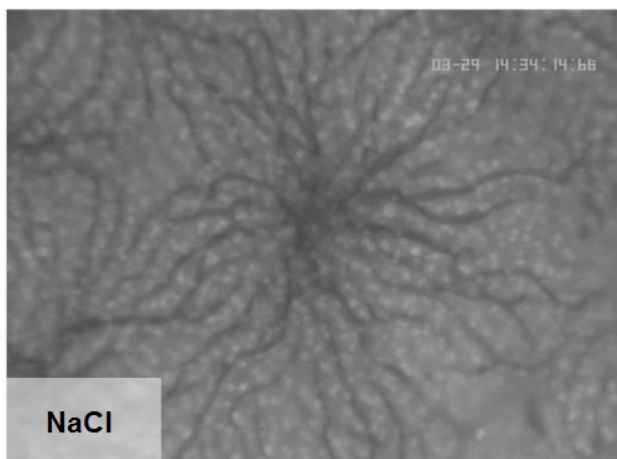


Abb. 20: IVM-Aufnahmen der hepatozellulären Apoptose. Dargestellt sind repräsentative Aufnahmen der Gruppen **NaCl** (HEP + NaCl), **G/L** (HEP + G/L), **siLuci + G/L** (DBTC4/Luci siRNA + G/L), **siFas + G/L**

(DBTC4/Fas siRNA + G/L) unter dem UV-Filter des IVM. Die apoptotischen Hepatozyten imponieren durch deutliche Leuchtintensitätsunterschiede aufgrund der Bindung von Bisbenzimid an fragmentiertem Chromatin (**A**).

4.3.1 Blutplasma-Analyse der Leberenzyme ALT und AST

Die Leberenzyme stellen etablierte Laborparameter zur Evaluation eines Lebergewebes Schadens dar. Beide Leberenzyme weisen analoge Ergebnisse in dieser Studie auf. Die Kontrollgruppen (NaCl, DBTC4siLuci und DBTC4siFas) zeigten eine ALT-Plasmaaktivität von ~50 U/L (siehe Abb. 20 A) und eine AST-Plasmaaktivität von ~65 U/L (siehe Abb. 20 B). Die Induktion eines ALV (G/L und siLuci + G/L) zeigte bei beiden Leberenzymen massive und signifikante Erhöhungen der Plasmaaktivität um das bis zu 12-fache auf 530 U/L (ALT) bzw. 620 U/L (AST). Eine Vorbehandlung mit DBTC4/Fas siRNA bei ALV resultierte in einer signifikanten Reduktion der ALT-Plasmaaktivität um 71% auf ~ 158 U/L. Die Reduktion der AST-Plasmaaktivität um 61% auf 247 U/L zeigte keine Signifikanz. Die Ergebnisse sind in einem Diagramm in Abb. 21 dargestellt.

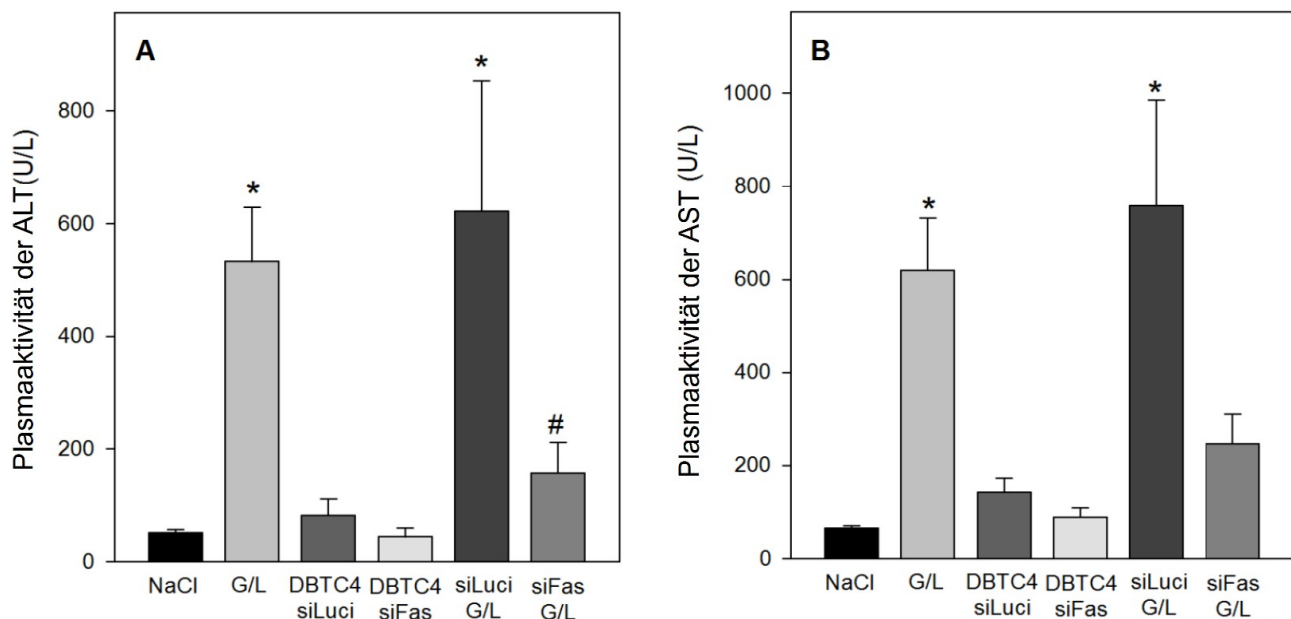


Abb. 21: Quantitative Analyse der Leberenzyme. Das Diagramm **A** zeigt die Ergebnisse der Erhebung der Plasmaaktivität der ALT in U/L, **B** stellt die Ergebnisse der AST in U/L dar. Die Daten sind als Mittelwerte \pm SEM angegeben, $n = 37$. ANOVA mit anschließendem Paarvergleich (* $p < 0,05$ vs. NaCl; # $p < 0,05$ vs. G/L). Versuchsgruppen: **NaCl** (HEP + NaCl), **G/L** (HEP + G/L), **DBTC4 siLuci** (DBTC4/Luci siRNA + NaCl), **DBTC4 siFas** (DBTC4/Fas siRNA + NaCl), **siLuci G/L** (DBTC4/Luci siRNA + G/L), **siFas G/L** (DBTC4/Fas siRNA + G/L).

4.3.2 Blutplasma-Analyse von IL-6

Die Kontrollen (NaCl, DBTC4siLuci und DBTC4siFas) zeigten Konzentrationen des PMN-, Lymphozyten-stimulierenden und Akute Phase Protein IL-6 zwischen ~15 und 50 pg/ml. Ein ALV hingegen zeichnete sich durch massive Erhöhungen der IL-6-Werte um das 10-fache auf ~ 430 pg/ml aus, was auf eine erhebliche Entzündungs- und Immunreaktion hinweist. Die Intervention mit DBTC4/Fas siRNA zeigte keine Reduktion der IL-6-Konzentration, was daraufhin deutet, dass auch nach Herabregulation des FasR noch eine massive Immunreaktion stattfindet. In Abb. 22 sind die Ergebnisse in einem Diagramm dargestellt.

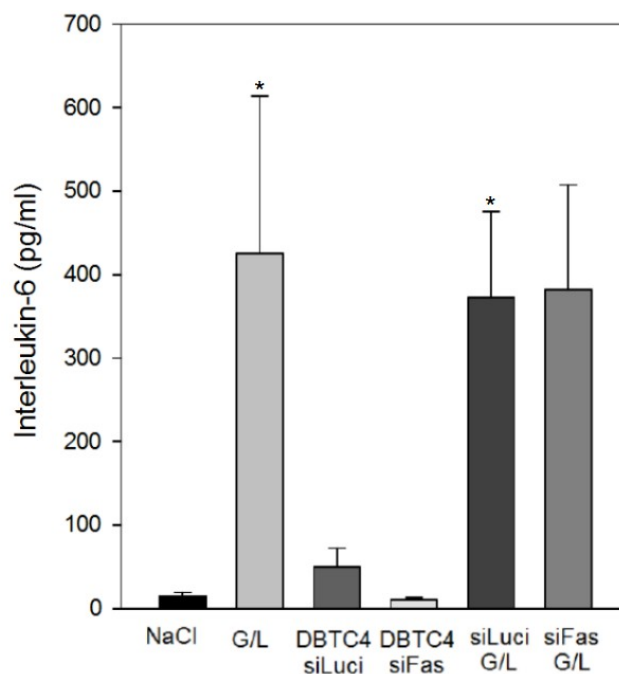


Abb. 22: Quantitative Analyse von IL-6. Das Diagramm zeigt die Ergebnisse der Erhebung der IL-6-Konzentrationen in pg/ml. Die Daten sind als Mittelwerte \pm SEM angegeben, $n = 37$. ANOVA mit anschließendem Paarvergleich (* $p < 0,05$ vs. NaCl). Versuchsgruppen: **NaCl** (HEP + NaCl), **G/L** (HEP + G/L), **DBTC4 siLuci** (DBTC4/Luci siRNA + NaCl), **DBTC4 siFas** (DBTC4/Fas siRNA + NaCl), **siLuci G/L** (DBTC4/Luci siRNA + G/L), **siFas G/L** (DBTC4/Fas siRNA + G/L).

4.4 Histologie/Immunhistochemie

4.4.1 HE-Histologie

Die HE-Färbung erfolgte zur histologischen Darstellung der Nekrose. Diese ist charakterisiert durch eine vermehrte Eosinophilie des Zytoplasmas der nekrotischen Zellen, mangelnde Kernfärbbarkeit bzw. Karyolyse und Verlust der Zellgrenzen durch Zerstörung der Zellmembranen sowie eine umgebende entzündliche Infiltration. Die Kontrollgruppen (NaCl, DBTC4siLuci und DBTC4siFas) zeigten einen sehr geringen Anteil von Nekrosen von maximal 3,6% des Lebergewebes, wohingegen die Induktion eines ALV (G/L und siLuci + G/L) zu signifikanten Erhöhungen der Nekrosen um das 16-fache auf ~35 - 58% führte. Die Vorbehandlung mit DBTC4/Fas siRNA zeigte eine nicht signifikante Reduktion der Nekrose im ALV um 65,5% im Vergleich zu den G/L-Gruppen. In Abb. 23 sind die Ergebnisse in einem Diagramm gezeigt und in Abb. 24 sind repräsentative histologische Aufnahmen gezeigt.

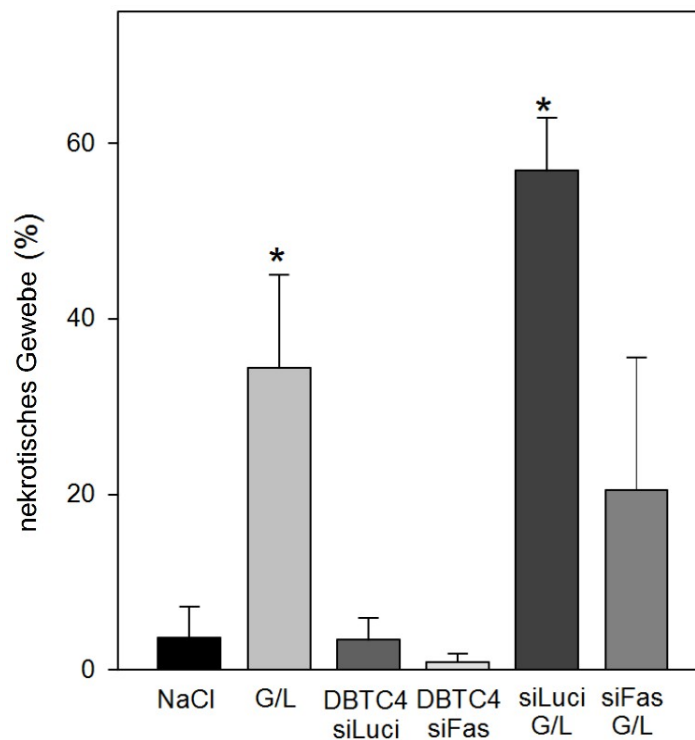


Abb. 23: Quantitative Analyse der Nekrose. Das Diagramm zeigt die Ergebnisse der Bestimmung des Anteils nekrotischer Areale im Lebergewebe in % des gesamten Lebergewebes. Die Daten sind als Mittelwerte \pm SEM angegeben, $n = 37$. ANOVA mit anschließendem Paarvergleich (* $p < 0,05$ vs. NaCl). Versuchsgruppen: **NaCl** (HEP + NaCl), **G/L** (HEP + G/L), **DBTC4 siLuci** (DBTC4/Luci siRNA + NaCl), **DBTC4 siFas** (DBTC4/Fas siRNA + NaCl), **siLuci G/L** (DBTC4/Luci siRNA + G/L), **siFas G/L** (DBTC4/Fas siRNA + G/L).

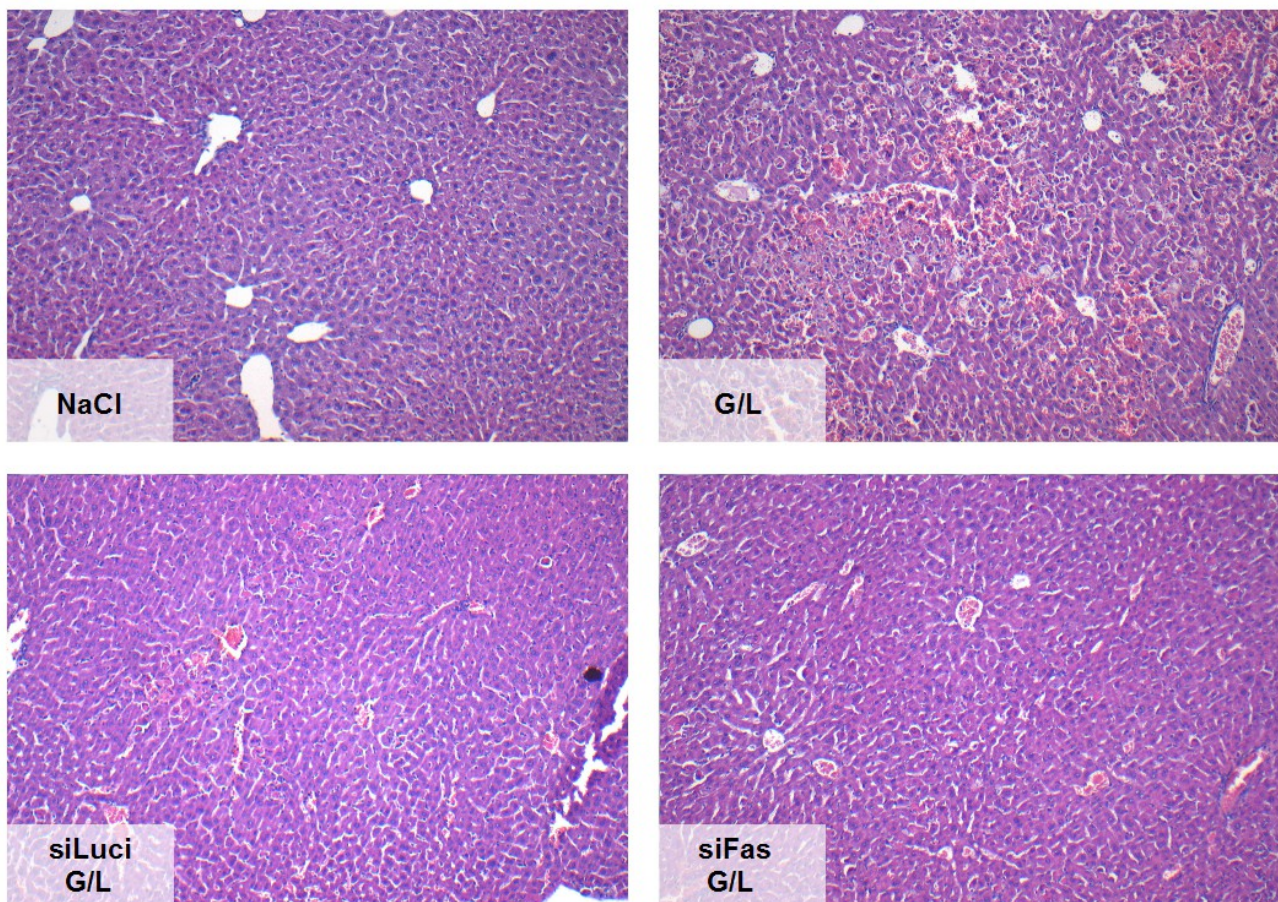


Abb. 24: Histologische Aufnahmen HE gefärbter Lebergewebsschnitte. Dargestellt sind repräsentative Aufnahmen der Gruppen **NaCl** (HEP + NaCl), **G/L** (HEP + G/L), **siLuci + G/L** (DBTC4/Luci siRNA + G/L), **siFas + G/L** (DBTC4/Fas siRNA + G/L). Histomorphologisch gut abgrenzbar sind die nekrotischen Veränderungen. Dazu gehört die vermehrte Eosinophilie des Zytoplasmas der nekrotischen Zellen, das Fehlen der Zellkerne, der Verlust der lebertypischen Parenchymstruktur und die leukozytäre Gewebsinfiltration. Diese charakteristischen Veränderungen sind gut in der **G/L**-Gruppe zu erkennen.

4.4.2 CAE

Die Kontrollgruppen (NaCl, DBTC4siLuci und DBTC4siFas) zeigten eine sehr geringe Anzahl CAE-positiver Leukozyten von < 3 pro GF, wohingegen die Induktion eines ALV (G/L und siLuci + G/L) zu deutlichen, teilweise signifikanten Erhöhungen um das 10-fache auf ~20 - 30 CAE-positive Leukozyten pro GF führte. Die Vorbehandlung mit DBTC4/Fas siRNA zeigte mit ~ 17 Leukozyten pro GF eine geringe, nicht signifikante Reduktion CAE-positiver Zellen um 37%. Abb. 25 stellt die Ergebnisse in Form eines Diagramms und Abb. 26 repräsentative Aufnahmen der CAE-Immunhistochemie dar.

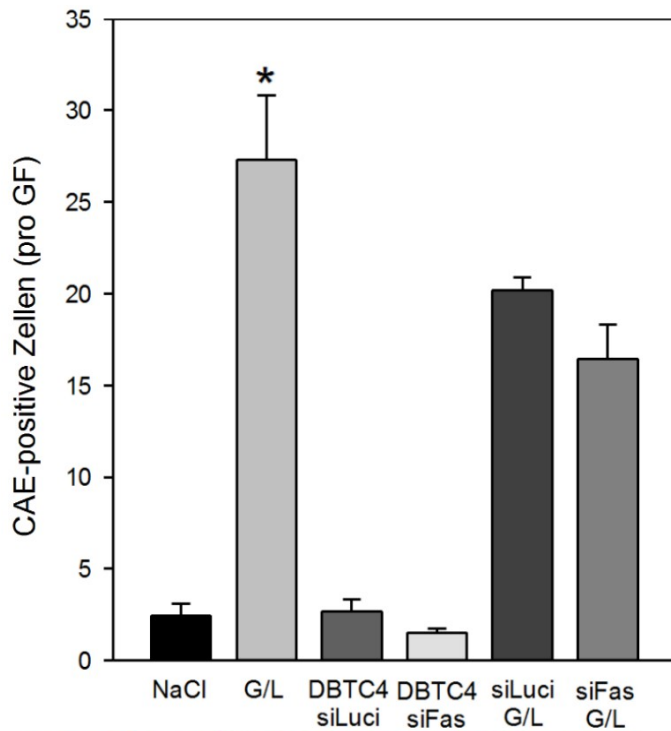


Abb. 25: Quantitative Analyse der histologisch ausgewerteten Leukozytengewebseinfiltration.

Das Diagramm zeigt die Ergebnisse der Infiltration des Lebergewebes durch CAE-positiv gefärbte Leukozyten pro GF. Die Daten sind als Mittelwerte \pm SEM angegeben, $n = 37$. ANOVA mit anschließendem Paarvergleich (* $p < 0,05$ vs. NaCl). Versuchsgruppen: **NaCl** (HEP + NaCl), **G/L** (HEP + G/L), **DBTC4 siLuci** (DBTC4/Luci siRNA + NaCl), **DBTC4 siFas** (DBTC4/Fas siRNA + NaCl), **siLuci G/L** (DBTC4/Luci siRNA + G/L), **siFas G/L** (DBTC4/Fas siRNA + G/L).

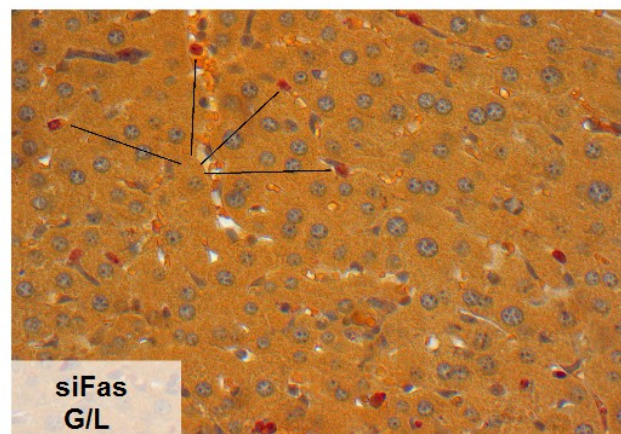
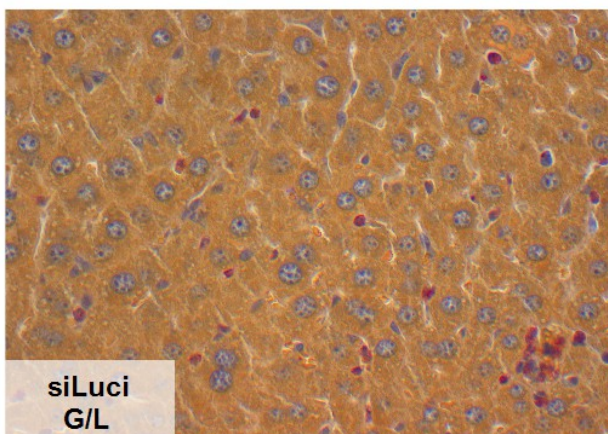
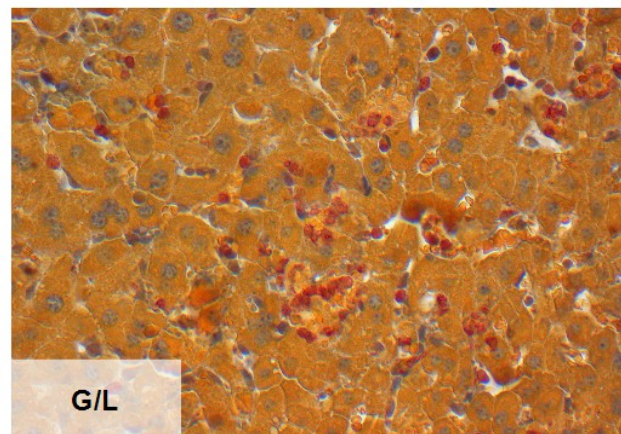
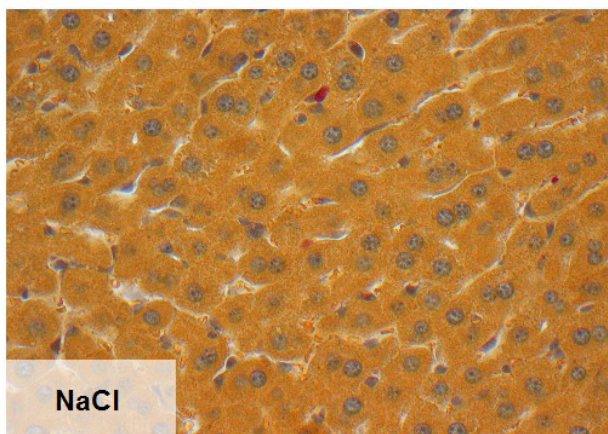


Abb. 26: Histologische Aufnahmen CAE gefärbter Lebergewebsschnitte. Dargestellt sind repräsentative Aufnahmen der Gruppen **NaCl** (HEP + NaCl), **G/L** (HEP + G/L), **siLuci + G/L** (DBTC4/Luci siRNA + G/L), **siFas + G/L** (DBTC4/Fas siRNA + G/L). Histomorphologisch lassen sich die bräunlichen Hepatozyten von

den CAE-positiven, rot-violetten Leukozyten (-) abgrenzen, die geringfügig in der Kontrollgruppe (NaCl) und zahlreich in den ALV-Gruppen (G/L und siLuci + G/L) zu sehen sind.

4.4.3 Cleaved Caspase-3

Die Auswertung der cleaved Caspase-3 stellt eine Möglichkeit zur Verifizierung der IVM Ergebnisse der hepatozellulären Apoptose dar. In den Kontrollgruppen (NaCl, DBTC4siLuci und DBTC4siFas) zeigten sich < 1 cleaved Caspase-3 positive Hepatozyten pro GF. Die Induktion eines ALV (G/L und siLuci + G/L) resultierte in einer signifikanten Erhöhung der Anzahl cleaved Caspase-3 positiver Hepatozyten auf > 30 pro GF. Eine Vorbehandlung mit DBTC4/Fas siRNA führte im ALV zu einer Reduzierung der Anzahl apoptotischer Hepatozyten um 58% auf ~ 10 pro GF. Die Abb. 27 zeigt die Ergebnisse in einem Diagramm und Abb. 28 zeigt repräsentative Aufnahmen der cleaved Caspase-3-Immunhistochemie.

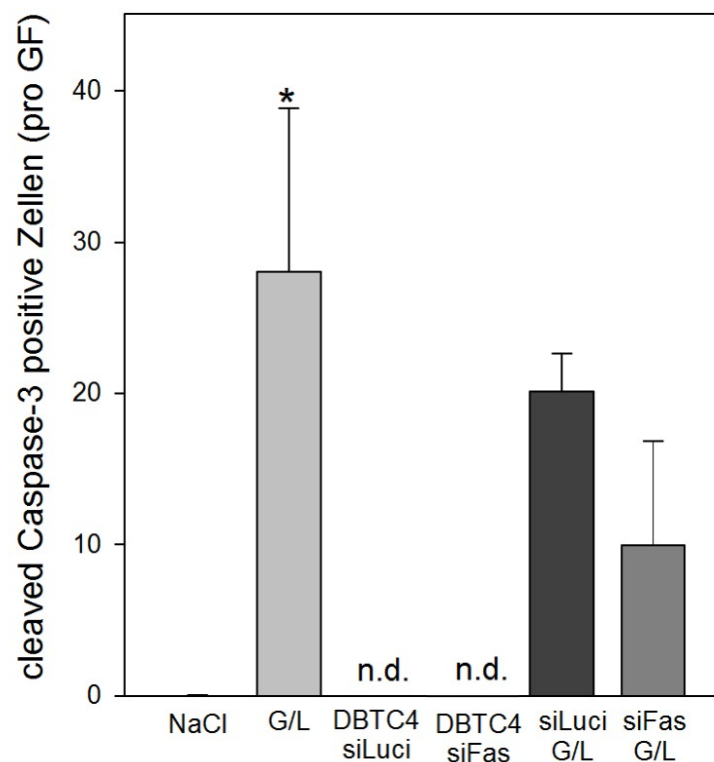


Abb. 27: Quantitative Analyse der histologisch ausgewerteten Apoptose. Das Diagramm zeigt die Anzahl der apoptotischen, cleaved Caspase-3 positiven Hepatozyten pro GF. Die Daten sind als Mittelwerte \pm SEM angegeben, $n = 37$. ANOVA mit anschließendem Paarvergleich (* $p < 0,05$ vs. NaCl). Versuchsgruppen: **NaCl** (HEP + NaCl), **G/L** (HEP + G/L), **DBTC4 siLuci** (DBTC4/Luci siRNA + NaCl), **DBTC4 siFas** (DBTC4/Fas siRNA + NaCl), **siLuci G/L** (DBTC4/Luci siRNA + G/L), **siFas G/L** (DBTC4/Fas siRNA + G/L).

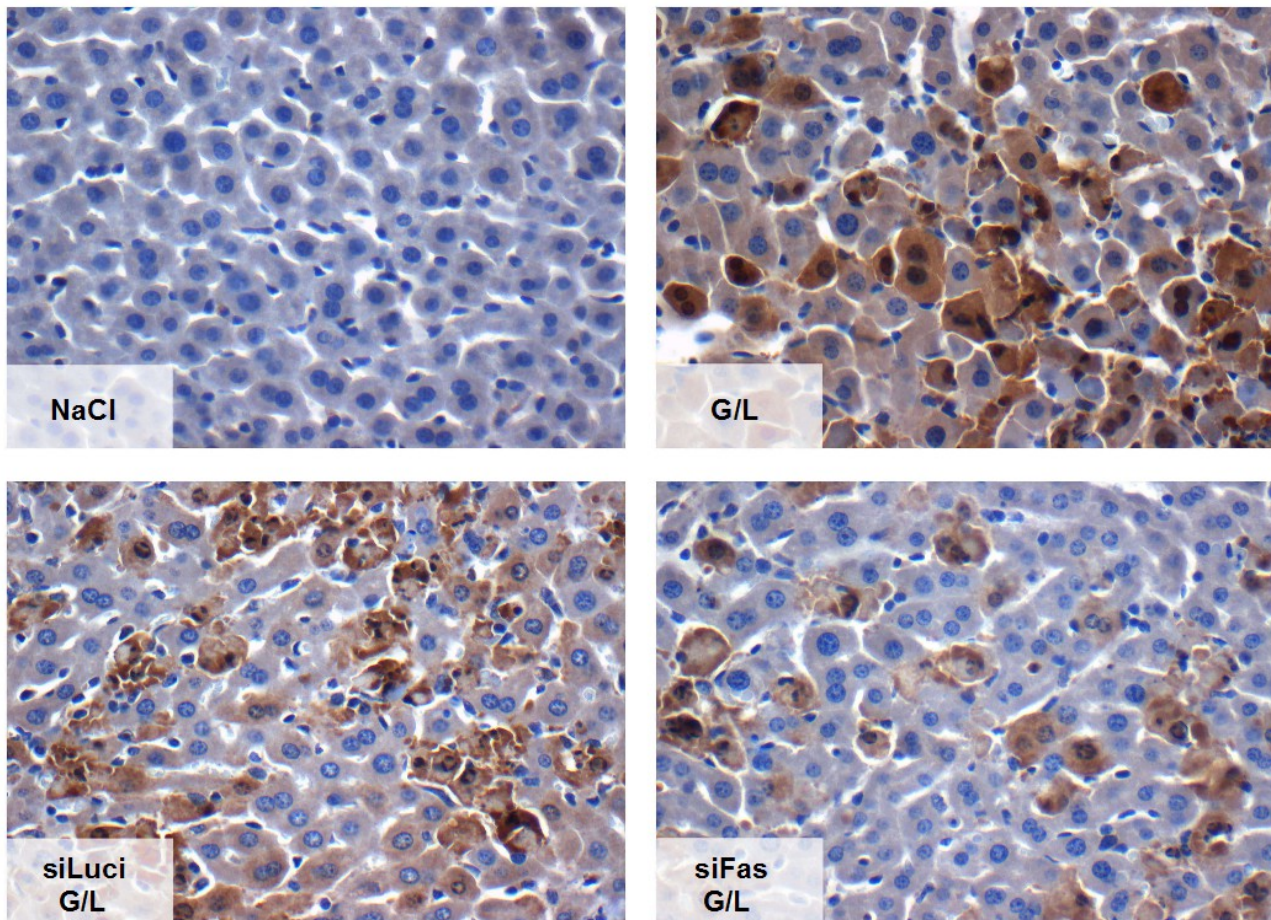


Abb. 28: Histologische Aufnahmen cleaved Caspase-3 gefärbter Lebergewebsschnitte. Dargestellt sind repräsentative Aufnahmen der Gruppen **NaCl** (HEP + NaCl), **G/L** (HEP + G/L), **siLuci + G/L** (DBTC4/Luci siRNA + G/L), **siFas + G/L** (DBTC4/Fas siRNA + G/L). Histomorphologisch imponieren apoptotische, cleaved Caspase-3 positiv gefärbte Hepatozyten mit bräunlicher Anfärbung des Zytoplasmas. Vitale, cleaved Caspase-3 negative Hepatozyten sind blau gegengefärbt.

4.5 Überleben

Die ALV-Gruppe (G/L) zeigte eine Letalität von 100%. Die $n = 10$ Versuchstiere verstarben zwischen der fünften und sechsten Stunde nach Induktion des ALV. In der DBTC4/Fas siRNA-Therapiegruppe überlebten $n = 4$ von 10 Tieren die ALV-Induktion über den Beobachtungszeitraum von 48 Stunden. Das Versterben der Tiere vollzog sich über einen Zeitraum zwischen der fünften und achten Stunde nach Exposition mit G/L. Abb. 29 zeigt die Ergebnisse in einem Diagramm.

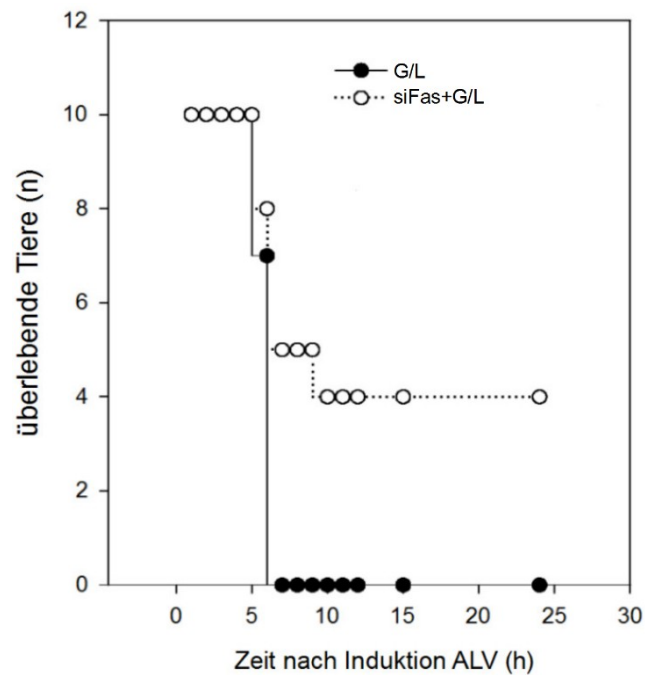


Abb. 29: Überlebensstudie. Das Diagramm zeigt die Ergebnisse des Überlebensversuches zur Bestimmung der Letalität des G/L-vermittelten ALV und bei Vorbehandlung mit siRNA. Der Vergleich erfolgte zwischen zwei jeweils $n = 10$ (y-Achse) Tieren umfassenden Gruppen, die HEP + G/L (**G/L**) oder DBTC4/Fas siRNA + G/L (**siFas + G/L**) appliziert bekamen. Die Induktion des ALV erfolgte zum Zeitpunkt 0 der x-Achse, welche die Zeit in Stunden abbildet. Tiere, die nach 48 Stunden noch lebten, galten als Überlebende.

5 Diskussion

In dieser Studie wurde die Rolle des FasR, dessen Expression auf Hepatozyten mittels siRNA herabreguliert wurde, experimentell im Mausmodell eines durch G/L-induzierten ALV untersucht.

5.1 Diskussion der Untersuchungstechniken

Die IVM bietet die Möglichkeit der Darstellung dynamischer Prozesse in physiologischer Umgebung mit der Option einer Anfärbung bestimmter und zu untersuchender Strukturen mit Fluoreszenzfarbstoffen. Dadurch lassen sich gezielt dynamische Prozesse und pathophysiologische Interaktionen darstellen (Vollmar und Menger, 2009). Die IVM ermöglicht quantitative Bestimmungen wie die Auszählung von Zelltypen, Messungen von Gefäßdurchmessern und die Beurteilung und Berechnung von Perfusionsausfällen (Kuchmiy et al., 2012). Eine große Bedeutung kommt der IVM zur Untersuchung von Immunreaktionen und daran beteiligten Immunkomponenten in Ischämie/Reperfusions-, Angiogenese- und mikrovaskulären Thrombosierungsversuchen sowie Regenerationsprozessen nach Transplantation zu (Kuchmiy et al., 2012).

Die IVM stellt eine geeignete Untersuchungsmethode zur Beurteilung einer Leberschädigung im Rahmen eines ALV dar, weil sie Mikrozyklationsstörungen, Leukozyten-Endothelzell-Interaktionen und Zelluntergangsvorgänge *in vivo* darstellen kann und nachträglich quantitative Bestimmungen zulässt. Eine Einschränkung der IVM ist, dass eine *in-situ*-Untersuchung des Verhaltens extravasaler Leukozyten nicht möglich und bislang weitgehend unerforschtes Gebiet ist, obwohl Kenntnis dieser Prozesse zu einem besseren Verständnis des Leberversagens führen könnten (Mempel et al., 2004).

Experimentelle Untersuchungstechniken wie die IVM bedürfen einer chirurgischen Präparation, um Gewebe oder Organe einer angemessenen Darstell- und Auswertbarkeit zuzuführen. Organumlagerungen und chirurgische Interventionen sind, abhängig vom Umfang des Gewebstraumas, eigenständige Reize für Entzündungsgeschehen. So führt eine Austrocknung chirurgisch freigelegter Gewebe zu massiver mikrozyklatorischer Dysfunktion und damit zu einer Beeinträchtigung des Versuches und der Ergebnisse (Mempel et al., 2004). Die mit einer chirurgischen Intervention verbundene Notwendigkeit einer suffizienten Anästhesie bedingt weitere physiologische Alterationen in den Bereichen Atmung, Sauerstoffversorgung, Makro- und Mikrozyklation (Mempel et al., 2004; Kuchmiy et al., 2012). Die Minimierung der Austrocknung erfolgte in unserem Versuch durch Abdeckung des chirurgisch freigelegten, nicht dargestellten Abdomens mit NaCl-getränkten Kompressen. In allen etablierten Tiermodellen wird die

Darstellungsqualität und Auswertbarkeit der Bilder durch Muskelkontraktionen, in- und expiratorische Bewegungen, den Herzschlag bzw. arterielle Pulsationen beeinträchtigt. Durch eine Kombination aus Fixierung der Gewebe ohne diese zu beschädigen und eine entsprechende Anästhesie sollen diese Einflussfaktoren möglichst gering gehalten werden (siehe Abb. 5, Material und Methoden) (Pittet und Weissleder 2011).

Die Anästhesie von Nagetieren mit Ketamin und Xylazin stellt dabei ein etabliertes Protokoll zur Schmerz-, Bewusstseinsausschaltung und Muskelrelaxierung dar (Arras et al., 2001). Die Alterationen, die obligat im Rahmen der Anästhesie und der chirurgischen Präparation auftreten, wurden durch ein standardisiertes Anästhesieprotokoll minimiert.

Die Kopplung von Fluoreszenzfarbstoffen an Zellen, Proteine oder Zellbestandteile verändert die Isomerie der Moleküle und kann deren Verhalten beeinflussen. Die in der vorliegenden Studie verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe Natriumfluoreszin, Rhodamin-6G und Bisbenzimid sind jedoch kleine Moleküle, deren Einfluss auf das Verhalten der gekoppelten Strukturen vernachlässigbar ist. Andere Auswirkungen können phototoxische Effekte sein, die in Abhängigkeit der zugeführten Lichtenergie auftreten und das Zellverhalten beeinflussen. Hohe Energiedosen sind eine mögliche Ursache der Leukozytenextravasation in Anwesenheit von Fluoreszenzfarbstoffen wie Acridin Orange oder Rhodamin-6G (Saetzler et al., 1997). Durch gewichtsadaptierte standardisierte Applikationsvolumina, die auch in anderen Studien Verwendung finden, ist der Einfluss dieses Faktors für alle Versuchstiere gleich und lässt sogar Vergleiche zu anderen experimentellen Versuchen zu. Die in dieser Studie erhobenen Ergebnisse zeigen Perfusionsverluste, Leukozyten-Endothelzell-Interaktionen und durch Apoptose bzw. Nekrose hervorgerufene Leberzelluntergänge, die mit Resultaten anderer Veröffentlichungen übereinstimmen (Li et al., 2004; Thorlacius et al., 2006; Le Minh et al., 2007).

Zusätzlich wurden zu den IVM-Aufnahmen laborchemische und histologische Untersuchungen durchgeführt. Die Plasmaaktivität der Leberenzyme ALT und AST wird auch klinisch zur Beurteilung einer Leberschädigung herangezogen. Dabei korreliert die Erhöhung der Enzymkonzentration mit dem Ausmaß und dem Schweregrad der Organschädigung (Lotze und Tracey, 2005). Leichte Leberzellschäden führen zu einer Erhöhung der ALT, die im Zytoplasma der Hepatozyten lokalisiert ist, wohingegen schwere Alterationen zur Freisetzung der größtenteils in den Mitochondrien befindlichen AST führen. Bei schwergradigen Integritätsstörungen kann es sich z.B. um Nekrosevorgänge handeln. Die Bestimmung der Leberenzyme ist zudem untersucherunabhängig, sodass dies eine objektive Einschätzung der Schädigung erlaubt und somit eine Möglichkeit zur Kontrolle der anderen Parameter und Ergebnisse darstellt.

IL-6 ist ein Zytokin mit kurzer Halbwertszeit und nimmt eine Schlüsselposition im Verlauf von Immunreaktionen dar, indem es den Übergang der Aktivität des angeborenen Immunsystems zum

Erworbenen darstellt und sensitiv systemische Entzündungsreaktionen anzeigt. Trewby et al. stellten zuerst fest, dass die Zytokinprofile im ALV und im septischen Schock übereinstimmen (Trewby et al., 1977). Obwohl es sich hierbei um zwei unterschiedliche Krankheitsbilder handelt, sind die Verläufe der Zytokinprofile so ähnlich, dass davon auszugehen ist, dass es pathophysiologische Überschneidungen, z.B. in Bezug auf die unkontrollierte Aktivierung des angeborenen Immunsystems, gibt (Antoniades et al., 2008).

5.2 Diskussion des G/L-induzierten ALV-Modells

Es werden zahlreiche Anforderungen an ein Tiermodell gestellt. Die Hauptanforderungen sind eine Reversibilität, d.h. die Schädigung soll im Fall einer erfolgreichen therapeutischen Intervention umkehrbar sein. Das Modell soll reproduzierbar sein. Ein therapeutisches Fenster, das zeitliche Intervall zwischen Einsetzen der Schädigung und Organversagen, soll lang genug für eine Therapie sein. Bei Unwirksamkeit einer Therapie sollten die Tiere am Leberversagen, bzw. dessen Konsequenzen versterben (Terblanche and Hickman 1991, Belanger und Butterworth 2005). Nachteile, die allen Tiermodellen gemein sind, bestehen im Fehlen supportiver therapeutischer Maßnahmen und eingeschränkten Monitoringmöglichkeiten, wie sie im klinischen Alltag üblich wären.

Es gibt verschiedene Ansätze, um ein ALV im Tiermodell zu verursachen. Hauptsächlich handelt es sich dabei um chirurgische und pharmakologische Interventionen.

Die chirurgischen Methoden umfassen Leberresektionen, die Hepatektomie und Devaskularisationen bzw. Gefäßligationen (Rahman und Hodgson 2000). Bei Leberresektionen werden bis 90% des Lebergewebes chirurgisch entfernt (Panis et al., 1997). Das verbliebene Lebergewebe wird aufgrund des erhöhten portalen Durchflusses geschädigt und sezerniert Zytokine, die in ein Organversagen münden (Kahn et al., 1984; Hanna et al., 1988). Hepatektomien entfernen das Lebergewebe vollständig. Die Devaskularisierungsmodelle beruhen auf der Anlage eines portocavalen Shunts und der Ligation der A. hepatica. Durch den hypoxischen Stimulus entwickeln sich Apoptosen und Nekrosen infolge von DNA-Schädigungen, KC- und Komplementaktivierungen (Losser und Payen 1996, Rahman und Hodgson 2000).

Den chirurgischen Modellen gemeinsam ist ihre schwierige, untersucherabhängige Präparation, das Fehlen der Umkehrbarkeit des Organversagens und das Fehlen charakteristischer Zytokinprofile bzw. Immunreaktionen, die beim humanen ALV pathophysiologisch eine wichtige Rolle spielen (Rahman und Hodgson 2000).

Neben den chirurgischen Modellen gibt es pharmakologische Ansätze, welche die Applikation verschiedener chemischer Substanzen wie D-Galn, Acetaminophen (Paracetamol), Carbon-

tetrachlorid, Thioacetamid, Concanavalin A, LPS und Kombinationen dieser Substanzen umfassen. Probleme ergeben sich hier aufgrund variabler Dosierungsmöglichkeiten, unterschiedlichen Ansprechens der Tierarten bzw. -stämme (Mizuhara et al., 1998), Störanfälligkeiten durch Interaktionen mit den verschiedenen Anästhetika oder eines Risikos für Untersucher, beispielsweise durch Versuche mit dem sehr giftigen Schwefelwasserstoff.

Ein pharmakologisches Modell ist das epidemiologisch hochrelevante Acetaminophenmodell, das aufgrund der zahlreichen Vergiftungen in Industriestaaten von großem Interesse ist. Nachteile des Acetaminophenmodells sind plötzliche Tode der Versuchstiere durch eine Methämoglobinämie, Unterschiede in der Metabolisierung des Pharmakons aufgrund individueller Cytochrom P 450-Ausprägungen der Versuchstiere und die Schädlichkeit für andere Organe wie Herz, Lunge und Niere (Eguia und Materson 1997), sodass eine auf die Leber begrenzte Betrachtung nicht sinnvoll erscheint. Aufgrund dieser relevanten Nachteile haben wir uns gegen die Verwendung des Acetaminophenmodells für unsere Studie entschieden.

D-Galn ist ein Aminosucker und führt durch Erschöpfung von Uridinnukleotiden zur Blockade der hepatozellulären Proteinsynthese (Keppler und Decker 1971). Dies stellt nicht den direkten Auslöser eines ALV dar, sondern führt zu einer erhöhten Anfälligkeit der Hepatozyten für andere Schäden (Takashi et al., 1990). In Kombination mit LPS induziert D-Galn eine Schädigung, die eine erhebliche Reaktion des angeborenen Immunsystems hervorruft (Buras et al., 2005). Es kommt zur Sezernierung zahlreicher proinflammatorischer Zytokine, Rekrutierung von PMN, einer Komplementaktivierung mit konsekutiver Thrombenbildung, Mikrozirkulationsstörungen und Zelluntergängen (Pagani et al., 1996; Rahman und Hodgson 2000). Das Zeitintervall zwischen Erregerexposition und Symptomentwicklung im Tiermodell umfasst dabei nur wenige Stunden, in denen sich sehr hohe Werte proinflammatorischer Zytokine und ein Organversagen entwickeln. Ein ALV beim Menschen zeigt Verläufe von Tagen bis Wochen. Die Letalität des Tiermodells ist mit bis 90% ungleich höher als Ergebnisse klinischer Studien nahelegen (Remick et al., 2000), allerdings ist zu beachten, dass die Letalität des ALV beim Menschen vor Etablierung der Lebertransplantation als Therapiemöglichkeit ebenfalls 90% erreichte (Lee, 2012).

Jedes der vorgestellten Modelle besitzt andere Eigenschaften, Vor- und Nachteile, sodass sie, entsprechend der zu untersuchenden Fragestellung eine unterschiedlich gute Eignung zur Widerspiegelung der Kinetik des jeweiligen Versuches haben. Modelle, die auf einer Applikation bakterieller Erreger beruhen, eignen sich bsp. in erster Linie zur Aufklärung pathophysiologischer Prozesse, die durch die Immunantwort des Wirtsorganismus hervorgerufen werden.

Das in der vorliegenden Studie verwendete G/L-Endotoxinmodell stellt ein etabliertes tierexperimentelles Protokoll zur Induktion pathophysiologischer Reaktionen in der Leber dar. Die D-Galn-assoziierte Sensitivierung der Hepatozyten bewirkt eine zuverlässige Schädigung des

Lebergewebes durch LPS. Dieses isolierte Organversagen ermöglicht eine Ausschaltung von Störfaktoren durch Schädigung anderer Organsysteme und im Vergleich zu anderen Modellen ein hohes Maß an Standardisierung, Reproduzierbarkeit und Vergleichbarkeit, wenngleich das therapeutische Fenster zeitlich eingeschränkt ist.

Einen Limitierungsfaktor stellt die Applikation des Therapeutikums in diesem Modell dar. SiRNA ist im Serum instabil, sodass es einer speziellen Formulierung bedarf, um die siRNA Moleküle ihrem Wirkort in ausreichender Konzentration zuzuführen. Experimentell wurde dies bisher durch hydrodynamische Injektion erreicht. Diese bedarf sehr hoher Applikationsvolumina von 1,6 - 2 ml (Wesche-Soldato et al., 2005; Zhang et al., 2014). Das Blutvolumen einer Maus beträgt circa 6% des KG (Raabe et al., 2011). Das entspricht bei 20 - 25 g schweren Tieren einem Volumen von 1,2 - 1,5 ml. Rechnet man dies auf KG und Blutvolumen beim Menschen um, so ergibt sich, bei Annahme eines Blutvolumens von 4,6 - 5,6 l eine Infusion von 4,9 - 9,3 l des Therapeutikums, welche über einen sehr kurzen Zeitraum zu applizieren wäre. Dies ist selbst in der modernen Intensivmedizin nicht umsetzbar. Es sind verschiedene Modifikationen denkbar, um die hydrodynamische Applikation zu umgehen. So könnte eine Änderung der Darreichungsart bzw. des -ortes durch eine Punktion der Portalvene eine Lokalthherapie der Leber ermöglichen. Dies ist allerdings technisch aufwändig und mit weiteren Gefahren und Komplikationen vergesellschaftet. Ein anderer tierexperimenteller Ansatz ist eine Verteilung der Applikation über mehrere Injektionen, da lediglich eine Herabregulation von 20% des Ziel-Gens bei einmaliger Injektion nackter siRNA erzielt wird (Song et al., 2003).

Die von uns verwendete, mit leberspezifischen Lipoplexen umhüllte DBTC4/Fas siRNA hingegen wird in einer einmaligen Injektion mit einem Volumen von 0,3 ml systemisch appliziert. Eine chirurgisch aufwändige Präparation zur lokalen Therapie ist nicht erforderlich. Die Applikation entspräche, umgerechnet auf das durchschnittliche Gewicht eines Menschen, einer Infusion von 0,92 - 1,4 l und damit einem klinisch einsetzbaren Infusionsvolumen. Voraussetzung für diese Übertragung vom Modell auf eine mögliche klinische Intervention wäre allerdings, dass sich Pharmakokinetik und -dynamik des Therapeutikums im humanen Organismus analog zum tierischen verhielten.

Ein weiterer Vorteil der Leberspezifität der DBTC4/Fas siRNA-Lipoplexe ist, dass systemische Folgen einer FasR-Unterexpression vermieden werden und eine gezielte Herabregulierung der hepatischen FasR-Expression erreicht werden kann, die andere derzeit angewendete Transportsysteme wie virale Vektoren, kationische Lipidformulierungen, Nanopartikel, Kohlenstoffnanoröhren und Kollagene nicht leisten können (Uchino et al., 2013). Die Ergebnisse der Kinetikuntersuchung bestätigten die gewünschte Leberspezifität der DBTC4/Fas siRNA-Lipoplexe. Die FasR-mRNA-Expression wurde lediglich in der Leber herabreguliert. In Herz, Lunge

und Nieren zeigte sich keine Beeinflussung der FasR-mRNA-Expression.

Die DBTC4 Lipoplexe allein zeigten ebenfalls keine Auswirkungen auf die gemessenen Parameter und das ALV, wie die Formulierung der Luciferase, einer non-sense-siRNA, in der vorliegenden Studie beweist. Die DBTC4/Luci siRNA wies bei keinem der erhobenen Parameter signifikant bessere Ergebnisse auf, lediglich bei der venulären Leukozytenadhärenz waren geringer ausgeprägte Werte als in der G/L-Gruppe zu verzeichnen.

Die Bedeutung der RNA-Interferenz für Gen-Expression, Protein-Homöostase und Erhaltung der Genomstruktur von Zellen legt den Schluss nahe, dass eine Dysregulation dieses Systems weitreichende Auswirkungen bis hin zur Verursachung bestimmter Erkrankungen haben kann. Beispielsweise führt eine Herabregulation von miR-1 und miR-133 *in vivo* zu einer kardialen Hypertrophie (Carè et al., 2007). Eine Herabregulation von miR-15 und miR-16 wurde bei 70% der Patienten mit chronischer lymphatischer Leukämie nachgewiesen (Uchino et al., 2013). Unsere Ergebnisse der Gruppe DBTC4/Fas siRNA + NaCl zeigten keine Ausfallerscheinungen der gemessenen Parameter, sodass eine Schädigung oder Beeinflussung der Zellhomöostase auf RNA-Ebene durch das Therapeutikum nicht stattzufinden scheint.

SiRNA konnte bereits in anderen Studien experimentell als erfolgreiche therapeutische Intervention angewendet werden. Durch siRNA, die gegen HBV RNA gerichtet war, konnte im Mausmodell eine HBV Genexpression und Vervielfältigung in den Hepatozyten der Versuchstiere unterdrückt werden (McCaffrey et al., 2003; Giladi et al., 2003). Bei Erkrankungen des Auges, wie der altersbedingten Makuladegeneration und der diabetischen Retinopathie, denen angiogenetische Veränderungen zugrunde liegen, wurde mittels einer VEGF siRNA die Gefäßeinsprossung und das Voranschreiten der Schädigung tierexperimentell reduziert (Ramachandran und Ignacimuthu, 2013). Im Rahmen einer Studie von Messer et al. 2013 wurde der Einfluss der Stilllegung von FasR, FADD und Caspase-3 miteinander verglichen. Die Herabregulation von FasR und FADD führte zu einer mildereren Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine und einer geringeren Immunreaktion, wohingegen das silencing der Caspase-3 zu einer deutlichen Verringerung der histologisch nachvollziehbaren Schäden am Lungenepithel führte (Messer et al., 2013). Die Formulierung einer Caspase-8 siRNA konnte erfolgreich ein ALV bei Mäusen verhindern (Zender et al., 2003). Nicht nur präklinisch verzeichnet die Intervention mit siRNA Erfolge. Eine VEGF siRNA wurde bis zur Phase III klinischer Studien untersucht, allerdings wurde die Studie aufgrund der Unterlegenheit gegenüber dem etablierten Lucentis vorzeitig abgebrochen (Ramachandran und Ignacimuthu, 2013).

Eine Beschränkung im Einsatz von siRNA ergibt sich dadurch, dass lediglich die laufende Proteinprozessierung stillgelegt wird. Demzufolge erfüllen Zielproteine mit einer langen Halbwertszeit noch nach siRNA Intervention ihre Funktion bis sie abgebaut werden (Contreras et

al., 2004). Ein silencing Effekt tritt demnach erst nach ihrem Abbau in Erscheinung. Dies widerspiegelte sich in unseren Zielfindungs- und Kinetikuntersuchungen. Bei der Applikation der DBTC4/siRNA 24 h vor G/L-Exposition war die mRNA-Expression von FasR um das 2,6-fache herabreguliert, die Proteinexpression von FasR allerdings nicht. Die Herabregulation der Proteinexpression wurde erst ab einem 48 h-Zeitfenster erreicht. Dies stellt speziell im Hinblick auf eine therapeutische Intervention, also die Verabreichung einer siRNA nach dem schädigenden Ereignis, eine große Herausforderung dar. In unserem Versuch erfolgte die Applikation im Sinne einer präventiven Maßnahme vor der Induktion des ALV. Bei zeitlich geringeren Abständen zwischen Injektion der DBTC4/Fas siRNA und der Induktion des ALV fand die Protektion der Leber in einem geringeren Umfang statt. Eine Möglichkeit diese Abstände zu verringern und sich so einer Therapie zu nähern, könnte die Erschöpfung des FasR oder der zellulären FasR-Proteine in den Zielzellen sein, sodass ein schnellerer Verbrauch bzw. Reduzierung der Rezeptoren eintritt.

5.3.1 Diskussion des ALV

Bei einem akuten Leberversagen kommt es zu einer komplexen und umfassenden immuno-inflammatorischen Reaktion, die ähnlich einem systemic inflammatory response syndrome den gesamten Organismus betrifft und durch eine massive Entzündungsreaktion mit exzessiver Zytokinausschüttung, einen Perfusionsverlust und Apoptose- und Nekrosevorgänge charakterisiert ist. Die Leber stellt hierbei nicht nur ein passives Ziel dar, sondern ist aufgrund ihrer Zell- und deren Rezeptorausstattung entscheidend an der Pathogenese der Organdysfunktion beteiligt (Matuschak et al., 2001). Die komplexen Mechanismen von Immunreaktionen werden in der Leber noch durch die Vielzahl immunkompetenter Zellpopulationen, darunter KC, natürliche Killerzellen, CD-8 positive Lymphozyten, dendritische Zellen, Sternzellen, sinusoidale Endothelzellen, Hepatozyten und Gallengangszellen verkompliziert (Bigorgne und Crispe, 2010).

Die Initiation der Inflammationsreaktion beginnt mit der Aktivierung der hepatischen KC, die ihrerseits zunächst die Endothelzellen der Leber zur Präsentation der Adhäsionsmoleküle E-Selektin und P-Selektin stimulieren. Dadurch kommt es zur Interaktion des aktivierten Endothels mit den Rezeptoren der Leukozyten, wodurch erst das sogenannte 'rolling'-Phänomen zu beobachten ist, bei dem es durch stärker werdende Interaktionsvorgänge zwischen leukozytären und endothelialen Rezeptoren zu einer Verlangsamung von Leukozyten im Blutstrom mit Anhaftung an das Endothel kommt. So konnten in der vorliegenden Studie bei den Versuchstieren nach ALV-Induktion intravitalmikroskopisch signifikante Erhöhungen des Leukozytenrollings nachgewiesen werden. Das Resultat dieses Vorgangs ist die Leukozytenadhärenz, die gleichzeitig eine wichtige Voraussetzung für die Diapedese darstellt. Nachdem die Leukozyten an den

hepatischen Endothelien adhäreren, wandern sie in das Leberparenchym ein. Die physiologische Aufgabe der rekrutierten PMNs besteht in der Opsonierung von Pathogenen und der Gewebeerneuerung, im Verlauf eines ALV ist diese Leukozyteninfiltration des Lebergewebes ein pathophysiologisch bedeutsames Ereignis (Jaeschke et al., 1996). So wird die Akkumulation von PMNs in den Lebersinusoiden von *Jaeschke und Hasegawa* als kritischster Infiltrationsort für die Entwicklung des Leberschadens im ALV angesehen (Jaeschke und Hasegawa, 2006). Ursache dieser Akkumulation ist eine Stase von Leukozyten in den Lebersinusoiden, die vor allem einem mechanischen, Hyaluron-vermittelten Steckenbleiben bei einem Ödem des Endothels und Vasokonstriktion entspricht (Vollmar und Menger, 2009). In der vorliegenden Studie zeigen die Versuchstiere nach ALV-Induktion intravitalmikroskopisch signifikante Erhöhungen der Leukozytenadhärenz und eine deutliche Zunahme der Infiltration des Leberparenchyms, die auch histologisch nachgewiesen wurde.

Das ALV verursacht neben der lokalen Entzündung auch eine systemische Inflammation, bei der proinflammatorische Zytokine eine wichtige Rolle spielen. Sie sind nicht nur an der Initiation der Entzündung beteiligt, sondern auch verantwortlich für die Einbeziehung, Aggravierung, Erhaltung der systemischen Inflammationskomponente und spielen eine zentrale Rolle bei der experimentellen LPS-induzierten Endotoxämie (Ulich et al., 1989). Diese massive systemische Inflammation konnte auch in der vorliegenden Studie durch einen signifikanten Anstieg der IL-6 Konzentration nach Induktion des ALV nachgewiesen werden.

Die Funktion der Mikrozirkulation ist die Sicherstellung der von den Zellen benötigten Sauerstoffzufuhr (Bateman et al., 2003). Zahlreiche Studien belegen, dass die tierexperimentelle Exposition mit LPS zu einer verschlechterten regionalen Organperfusion und Sauerstoffversorgung der Gewebe führt (Goldman et al., 2004; Boussekey et al., 2010; Legrand et al., 2011). Dies bestätigt sich in den Ergebnissen unserer Versuche zum hepatischen Perfusionsverlust. Das G/L-induzierte ALV zeigt signifikant erhöhte Perfusionsausfälle von bis zu 80% der Lebersinusoide. Dieser Perfusionsverlust könnte aus dem Ungleichgewicht einer überwiegenden Vasokonstriktion, einer Hyperkoagulabilität der Gerinnung, verschlechterten Fließeigenschaften der Blutbestandteile und einem Ödem des Endothels (Vollmar und Menger, 2009) resultieren, denn aufgrund der erhöhten Viskosität und Hyperkoagulabilität kommt es zur Ausbildung von Mikrothromben (Spronk et al., 2004) und damit zu einer Verbrauchskoagulopathie, die die Grundlage der todesursächlichen Blutungen im ALV darstellt. Unter diesen Hypoxiebedingungen werden FasR und FasL über einen TNFR- und CD40-abhängigen Mechanismus hochreguliert und führen zu einer verstärkten Apoptoseinduktion in betroffenen Geweben (Afford et al., 1999; Ke et al., 2005).

Apoptose ist ein Mechanismus, der es mehrzelligen Organismen ermöglicht, unerwünschte, erkrankte oder gealterte Zellen zu entfernen (Steller, 1995). Aufgrund der herausragenden

physiologischen Rolle der Apoptose bei der Erhaltung der Zellhomöostase ist es nicht verwunderlich, dass dieser Mechanismus evolutionär hoch konserviert ist (Ameisen, 1996). Der Evolutionsdruck hepatotrope Viren eradizieren zu können, um durch Zerstörung viral befallener Hepatozyten das Organ vor einer Infektion zu schützen, führte zu einer hohen Expression von verschiedenen Todesrezeptoren auf Hepatozyten (Yoon und Gores, 2002). Dadurch sind Hepatozyten sehr suszeptibel für extrinsische Apoptosesignale und viele Erkrankungen der Leber mit Apoptose assoziiert. Bei der alkoholischen Leberschädigung konnte gezeigt werden, dass die hepatische Apoptose signifikant bei alkoholischer Hepatitis erhöht ist (Kawahara et al., 1994) und die Schwere der Erkrankung mit der Anzahl apoptotischer Hepatozyten korreliert (Natori et al., 2001). Apoptosekörperchen, welche in der Histopathologie als Councilman-Körperchen bezeichnet werden, haben in der Leber ein charakteristisches Aussehen und sind zahlreich bei viralen Hepatitiden nachweisbar (Yoon und Gores, 2002). Auch hier korrelieren die Aktivität von Caspasen direkt mit der Schwere des Leberschadens (Bantel et al., 2001) und die FasR-Expression mit der Aktivität der Hepatitis (Hiramatsu et al., 1994). Auch wenn die Pathogenese des ALV nicht vollständig aufgeklärt ist, wird die Apoptose als führender Zelluntergangsmechanismus im ALV angesehen (Nagata et al., 1995; Leist et al., 1995; Afford et al., 1999; Ryo et al., 2000; Le Minh et al., 2007), wodurch ein massiver Verlust von funktionsfähigem Lebergewebe verursacht wird (Berr et al., 2005; Rutherford et al., 2008). In Übereinstimmung mit den Ergebnissen anderer Veröffentlichungen zeigen sich auch in der vorliegenden Studie massive Apoptosevorgänge in den ALV-Gruppen mit signifikanten Erhöhungen der Apoptosen in den intravitalmikroskopischen und immunhistochemischen Erhebungen.

Apoptotische Hepatozyten und durch Nekrose freigesetztes extrazelluläres ATP führen zu einer verstärkten Chemotaxis von Immunzellen (Hefeneider et al., 1992; Jaeschke 2002; Denk et al., 2012; Pittman und Kubes, 2013). Die rekrutierten PMNs sind mit einer Vielzahl von Enzymen ausgestattet. Ihre Vesikel enthalten unter anderem Lysozym, Kollagenase, Gelatinase, Histaminase, Defensine, Myeloperoxidase und Serinproteasen mit bakterizider Wirkung wie Kathepsin G, Proteinase-3 und Elastase (Faurschou und Borregaard, 2003). Die Enzyme der PMNs zeigen jedoch nur eine geringe Spezifität, sodass es zu einer beträchtlichen kollateralen Schädigung des umliegenden Gewebes kommt (Wagner und Roth, 1999; Kubes und Mehal, 2012). Diese pathologische, kollaterale Hepatozytenschädigung und die Verursachung einer Leberdysfunktion durch PMNs (Kubes und Mehal, 2012) wurde mittels zahlreicher experimenteller Versuche, darunter Ischämie-/Reperfusion (Jaeschke et al., 1990; Vollmar et al., 1994; Vollmar et al., 1995), Endotoxinschock-Modelle (Jaeschke et al., 1991; Vollmar et al., 1993) und Sepsis (Molnar et al., 1997) demonstriert.

Dabei freigesetzte Stickstoffradikale sind in der Lage die Ausschüttung proinflammatorischer

Mediatoren wie IL-8 auszulösen oder NF- κ B zu aktivieren, führen zu einer Schädigung von Proteinen, Lipiden und DNA, zur Erschöpfung mitochondrialer Enzyme und zur Verringerung des antioxidativen Potentials zellulärer ROS-Abwehrmechanismen (Virág et al., 2003; Crimi et al., 2006). Aktivierte PMNs sind eine Quelle exzessiver ROS-Freisetzung (Ciz et al., 2012), die auch die intrazelluläre Signaltransduktion als second messenger beeinflussen kann (Nathan, 2003). Pathophysiologisch grundlegend dabei ist, dass Zellen mit antioxidativen Mechanismen ausgestattet sind, die eine Neutralisierung von ROS ermöglichen. Leberzellen befinden sich unter physiologischen Bedingungen in einem moderat hypoxischen Milieu und sind mit einem umfassenden antioxidativen Potential durch Glutathion ausgestattet (Bhagal et al., 2012). Die Erschöpfung der antioxidativen Mechanismen durch massive ROS-Alterationen, die beispielsweise durch Ischämie/Reperfusion, Sepsis oder ausgeprägte Hypoxie hervorgerufen werden, führen jedoch zur Schädigung und Apoptose der Hepatozyten (Halliwell, 1994; Marnett et al., 2003; Malhi et al., 2006; Crimi et al., 2006; Hatwalne, 2012) und zur Ausbildung von Nekrosen. Ursache für die Entwicklung von Nekrosen sind durch Hypoxie hervorgerufene Energiereservoirdepletionen (Paxian et al., 2003). Diese Form des Zelltodes konnte auch in der vorliegenden Studie nachgewiesen werden. So kommt es nach Induktion eines ALVs zu einer signifikanten Erhöhung der Leberparenchymnekrose, welche zusätzlich durch signifikante Anstiege der Leberenzyme ALT und AST belegt wurden und indirekt auf einen hohen Anteil nekrotischer Hepatozyten schließen lassen.

5.3.2 Diskussion des Einflusses der DBTC4/Fas siRNA auf das ALV

Lange Zeit war es einer der Hauptansätze der ALV-Therapie durch eine Verhinderung der hepatozellulären Apoptose die Hepatozyten zu schützen und die Leberfunktion zu erhalten (Zender et al., 2011). Antiapoptotische Therapieansätze wie die Hemmung von Caspasen in Ischämie-/Reperfusionsmodellen (Cursio et al., 1999) und die Inhibition der caspase 3-like protease in der Endotoxinämie (Jaeschke et al., 1998) führten bereits in anderen Studien zu einer Verringerung der Leberzellschädigung in Tierversuchen. Die Attenuierung von TNF- α zeigte tierexperimentell präklinische Erfolge (Pennington, 1993), welche jedoch in klinischen Studien nicht bestätigt werden konnten (Remick et al., 2000). Andere Therapieansätze wie die Verabreichung des rekombinanten Wachstumsfaktors Darbepoetin- α , der sich vom Erythropoese-stimulierenden Glykoprotein Erythropoetin ableitet, führten zu einer Verringerung der Leberzellschädigung in Tierversuchen (Le Minh et al., 2007). Song et al. zeigten bereits 2003 erste therapeutische Erfolge mit der Verabreichung einer FasR siRNA durch hydrodynamische Injektion im Tiermodell (Song et al., 2003). 2011 konnten Zender et al. mittels einer Caspase-8 siRNA die hepatische Caspase-8

Expression herabregulieren und die hepatozelluläre Apoptose im ALV verhindern (Zender et al., 2011). Dabei handelte es sich um systemische Therapieansätze, die entsprechende Nebenwirkungen einer FasR-Herabregulation in anderen Organsystemen hervorrufen.

In unserer Studie hingegen konnte erstmals eine einmalig zu applizierende, leberspezifische siRNA erfolgreich *in vivo* eingesetzt werden, um eine Leberprotektion im Rahmen eines G/L-induzierten ALV zu erreichen. Die Verabreichung der DBTC4/Fas siRNA führt nach einmaliger systemischer Applikation zur Aufnahme in die Hepatozyten und zur Herabregulation der FasR-mRNA-Expression und der Expression des FasR auf der Zelloberfläche der Hepatozyten. Anhand der von den Hepatozyten aufgenommenen DBTC4/Fas siRNA mit der Basenabfolge 5'-GCAUCUCCGAGAGUUUAAA-3' des Leitstranges erkennt der intrazelluläre RISC komplementäre mRNA-Sequenzen, die nötig sind, um Proteine des FasR am Ribosom zusammenzubauen und baut diese ab. Dadurch wird der Zusammenbau des FasR verhindert und seine Expression auf der Zelloberfläche der Hepatozyten nimmt ab, da die bereits exprimierten FasR aufgrund ihrer Halbwertszeit abgebaut werden.

Durch diese FasR-Reduktion sind die Hepatozyten weniger anfällig für extrinsische Apoptosesignale, die als wesentlichster Zelltodursachen im ALV angesehen werden und von death receptors vermittelt werden. Unter den verschiedenen Todesrezeptoren, die auf Hepatozyten exprimiert werden, spielt FasR eine herausragende Rolle bei der Vermittlung der hepatozellulären Apoptose. So konnte bereits gezeigt werden, dass die hohe Expression von FasR in der Leber Anteil an der Pathogenese spezifischer Erkrankungen wie der viralen Hepatitis (Pianko et al., 2001), Steatohepatitis (Feldstein et al., 2003), Autoimmun-Hepatitis (Dienes und Drebber, 2010), Transplantatabstossung und -schädigung sowie in Ischämie/Reperfusionsversuchen (Neuman 2001) und im ALV hat (Nagata et al., 1995; Afford et al., 1999, Malhi et al., 2010). So kommt es bei Verabreichung von Antikörpern gegen FasR zu einem fulminanten ALV im Tierexperiment (Nagata et al., 1995) und *in vitro* zur Apoptose humaner Hepatozyten (Galle et al., 1995). Im Gegenzug konnten Kuhla et al. zeigen, dass FasR-defiziente Mäuse resistent gegen ein G/L-vermitteltes ALV sind (Kuhla et al., 2008). Eine Eigenschaft die den FasR hervorhebt, ist seine Fähigkeit die Expression von FasL auf Hepatozyten zu initiieren, wodurch diese befähigt werden benachbarte Hepatozyten zu eliminieren (Yoon und Gores, 2002) und so eine Schädigung der Leber durch weitere Apoptosen aggravieren können. Durch diese herausragenden Eigenschaften des FasR bei der hepatozellulären Apoptose konnte dessen Herabregulation mittels der DBTC4/Fas siRNA zu einer signifikanten Verringerung der Apoptose im G/L-vermittelten ALV führen.

Dennoch ist auch in den Therapiegruppen ein immer noch geringes Ausmaß an hepatozellulärer Apoptose zu verzeichnen. Ursache hierfür könnte eine unzureichende Distribution der DBTC4/Fas siRNA in der Leber sein, sodass es zu regionalen Unterschieden in der Herabregulation des FasR

gekommen sein könnte. Die Ursache dafür könnte die komplexe Architektur der Leber mit zwei Gefäßversorgungsstämmen und ausgedehnten Sinusoiden und Endotheloberflächen sein (Chen et al., 1996), sodass die DBTC4/Fas siRNA nicht überall in ausreichender Konzentration angekommen ist und es so in der Leber zu Abschnitten mit nicht ausreichender Herabregulation des FasR und dadurch konsekutiv zu Apoptosen gekommen ist. Eine weitere Erklärung liefern andere Todesrezeptorsysteme, die von Hepatozyten exprimiert werden. FasR ist zwar ein wichtiger death receptor, allerdings werden auf Hepatozyten auch TNFR und TRAIL exprimiert, die analog zu FasR extrinsische Apoptosesignale vermitteln (Tiegs et al., 1998; Han et al., 2002; Tukov et al., 2007).

Der Ligand von TNFR TNF- α wurde ursprünglich durch seine Eigenschaft entdeckt, in Tumoren hämorrhagische Nekrosen zu verursachen (Carswell et al., 1975). Der zunächst vielversprechende Einsatz als systemisches Chemotherapeutikum wurde durch schwere Nebenwirkungen verhindert (Kimura et al., 1987). Eine der wichtigsten Nebenwirkungen in diesem Zusammenhang ist die direkte Zytotoxizität von TNF- α für TNFR-tragende Zellen, insbesondere humane Hepatozyten. So zeigen Patienten mit ALV erhöhte TNF- α Konzentrationen (Streetz et al., 2000) und dazu korrelierend eine erhöhte Mortalität (Muto et al., 1988; Bird et al., 1990). Die hepatozelluläre Apoptose wird durch TNFR1 induziert. TNFR1 wird durch TNF- α trimerisiert und rekrutiert in einem mehrstufigen Prozess, der die Internalisierung des Rezeptors erfordert und durch Zusammenlagerung mit den intrazellulären Adapterproteinen den sogenannten Komplex I bildet (Hsu et al., 1995; Hsu et al., 1996; Hsu et al., 1996). Der Komplex I kann sich intrazellulär unter anderem mit FADD zum Komplex II zusammenlagern, der über die Spaltung der Pro-Caspase-8 zur Aktivierung der apoptotischen Signalkaskade durch die Effektorcaspasen führt (Wang et al., 2008). Dadurch kann mittels der Aktivierung des hepatischen TNFR1 auch FasR unabhängig die pathophysiologisch wichtige Apoptose im ALV ausgelöst worden sein.

Neben der Reduktion der Apoptose konnte die DBTC4/Fas siRNA die hepatische Nekrose verringern. Ein Teilaspekt der Erklärung ist, dass gezeigt werden konnte, dass sich Apoptose regelmäßig zu Nekrose entwickelt, da beide Zelltodformen keine vollständig voneinander unabhängigen Prozesse darstellen, sondern von anderen Autoren als Extreme eines kontinuierlichen Vorgangs eingeordnet worden sind, die Überschneidungen in sowohl Aktivierungsmechanismen als auch der Signalübertragung zeigen (Lemasters 1999; Malhi et al., 2006). So ist die Reduzierung der Nekrose zum Teil als Nebeneffekt der signifikanten Reduktion der Apoptose durch die DBTC4/Fas siRNA zu werten. Ein weiterer Faktor, der sich auf die Entstehung von Nekrose auswirkt, ist die Sauerstoffversorgung des Gewebes. Hepatozyten haben aufgrund ihrer hohen Biosynthese-, Sekretionsleistungen und Speicherfunktionen einen hohen Energiebedarf in Form des universellen, zellulären Energiespeichers ATP, dessen Synthese einer

intakten Atmungskette bedarf (Rolfe und Brown, 1997). Kommt es also unter Hypoxiebedingungen zu so massiven irreversiblen zellulären Schäden mit Energiereservoirdepletionen, entwickeln sich Nekrosen (Lemasters, 1999; Paxian et al., 2003; Crimi et al., 2006).

Diese hypoxischen Energiereservoirdepletionen werden vornehmlich durch das ALV-charakterisierende Perfusionsversagen hervorgerufen. Die DBTC4/Fas siRNA konnte das hepatische Perfusionsversagen im G/L-vermittelten ALV signifikant verringern und so auch die Ausbildung von Nekrosen reduzieren, was neben der Histologie auch serologisch durch die signifikante Reduktion der Leberenzyme ALT und AST nachgewiesen werden konnte.

Die Herabregulation des FasR durch DBTC4/Fas siRNA weist durch die Reduktion der Nekrose auch auf eine Verbesserung des hepatischen Energiestatus hin, für dessen Aufrechterhaltung primär die Mikrozirkulation verantwortlich ist. Diese Verbesserung der Mikrozirkulation durch die DBTC4/Fas siRNA ist vornehmlich darauf zurückzuführen, dass die FasR Herabregulation zu einer Protektion der hepatischen Endothelien führt, da FasR ein wichtiger Vermittler der Apoptose von Endothelzellen ist (Hutchins et al., 2013). Dies konnte bereits durch den Pan-Caspasen Inhibitor zVAD-fmk gezeigt werden, der die endotheliale Apoptose durch Fas und somit ein Perfusionsversagen experimentell verringerte (Wanner et al., 1999). Durch die Verringerung der endothelialen Apoptose könnte eine Bildung von Mikrothromben verhindert werden, da es durch das intakte Endothel nicht zu einer Gerinnungsaktivierung kommt. Dadurch wird nicht nur eine direkte antithrombotische Wirkung vermittelt, sondern auch indirekt eine durch Hypoxie und Gerinnungsfaktoren hervorgerufene Aktivierung von vasoaktiven, vorwiegend vasokonstriktorisches Substanzen wie Thrombin, Thromboxan A₂, Angiotensin II oder Endothelin verhindert, die sonst das Perfusionsversagen im ALV und der Endotoxinämie aggravieren (Tempel et al., 1986; Zhang et al., 1994; Baveja et al., 2002; Katagiri et al., 2004). Ein Beispiel dieser vasoaktiven Substanzen, deren Aktivierung verhindert bzw. reduziert werden konnte, ist Angiotensin II, welches durch Kontraktion der Sinusoid-umspannenden Sternzellen (Vollmar und Menger, 2009) zu einer Verengung der hepatischen Sinusoide zu einer verschlechterten regionalen Perfusion führen kann (Bataller et al., 2000).

Trotz der Inhibition der Endothelzellapoptose durch FasR Herabregulation kam es dennoch zur Ausbildung einer mikrozirkulatorischen Dyfunktion in der Therapiegruppe, welche allerdings gering ausgeprägt war. In diesem Zusammenhang ist die Arbeit von Tanaka et al. erwähnenswert, die in einem Tierexperiment nachweisen konnte, dass sich die mikrozirkulatorische Dysfunktion im Endotoxin-vermittelten ALV in der Leber regional heterogen ausprägt und so Bereiche der Leber entstehen, die gut perfundiert sind und andere Areale, die von einer mikrozirkulatorischen Dysfunktion und konsekutiven Apoptosen betroffen sind (Tanaka et al., 2014). Dadurch kann es in Zusammenschau mit einer regional unterschiedlichen DBTC4/Fas siRNA Distribution in der

vorliegenden Studie zu wenigen Arealen kommen, die trotz FasR-Herabregulation und veringertem Endothelzellapoptose eine mikrozirkulatorische Dysfunktion mit Perfusionsversagen ausbilden.

Ein weiterer Parameter, der durch die DBTC4/Fas siRNA signifikant verbessert werden konnte, ist die Leukozytenstase in den hepatischen Sinusoiden, mit der die Leukozyteninfiltration des Lebergewebes intravitalmikroskopisch bestimmt wurde. Hier zeigte die Herabregulation von FasR eine signifikante Verringerung der Leukozyteninfiltration um 72%. Dies steht in Einklang mit den Ergebnissen der hepatischen Perfusion, da die Leukozytenstase am ehesten einem mechanischen Steckenbleiben bei mikrozirkulatorischer Dysfunktion entspricht (Vollmar und Menger, 2009), die durch DBTC4/Fas siRNA nahezu verhindert werden konnte.

Zusätzlich zu seiner Funktion als prototypischer Todesrezeptor ist FasR als wichtiger Einflussfaktor bei bestimmten Auto-Immunerkrankungen, wie dem acute respiratory distress syndrome (Farnand et al., 2011), der Mukoviszidose (Becker et al., 2012), der Arthritis (Ma et al., 2004) und auch der Tumorentwicklung anerkannt (Mahmood und Shukla, 2010).

FasR spielt also auch eine wichtige Rolle bei der Initiation einer Reaktion des angeborenen Immunsystems, indem er indirekt zu einer Rekrutierung von PMNs führt (Faouzi et al., 2001; Jaeschke, 2002; Lomas-Neira et al., 2005; Messer et al., 2013). Somit beeinflusst FasR die Apoptose und Inflammation und damit die beiden wichtigsten pathophysiologischen Faktoren im ALV. Da dessen Herabregulation durch die DBTC4/Fas siRNA bereits die hepatische Apoptose, Nekrose und die Leukozytenstase reduzieren konnte, wäre auch eine positive Beeinflussung der Leukozyten-Endothelzell-Interaktion und der systemischen Inflammation zu erwarten, da durch die reduzierte hepatische Apoptose und die geringere Aktivierung des Gerinnungssystems und vasoaktiver Substanzen bereits mehrere Faktoren mit chemotaktischem Potential verringert werden konnten (Jaeschke 2002; Eipel et al., 2004).

So konnten bereits antiinflammatorische Therapiestrategien wie die Verabreichung von CORM-3, einem *carbon monoxide-releasing molecule* die Konzentrationen von ALT, AST, TNF- α und IL-6 in einem G/L-induzierten ALV-Tiermodell reduzieren und die Überlebensrate verbessern (Yan et al., 2016).

In unserer Studie zeigte die Herabregulation des hepatischen FasR durch Applikation der DBTC4/Fas siRNA nur eine geringe Reduktion der venulären Leukozyten-Endothelzell-Interaktion. Dies lässt sich darauf zurückführen, dass eine Vielzahl anderer Mechanismen unabhängig von FasR eine Rekrutierung von Immunzellen bewirken und die Leukozyten-Endothelzell-Interaktion verstärken. Das venuläre Leukozytenrolling und die Leukozytenadhärenz beruhen auf der Expression bestimmter Oberflächenmoleküle, deren Induktion vorwiegend abhängig von proinflammatorischen Zytokinen ist und die durch die DBTC4/Fas siRNA nicht beeinflusst wurden. TNF spielt hier eine bedeutsame Rolle (Mackay et al., 1993; Tiegs et al. 1998) und wird zusammen

mit den ebenfalls relevanten proinflammatorischen Mediatoren IL-1, IL-6 von aktivierten KC und G/L-exponierten Makrophagen sezerniert (Jaeschke, 2002). In anderen Studien konnte weiterhin gezeigt werden, dass TLR-4 auf Endothelzellen zusammen mit KC für die Vermittlung der venulären Adhärenz von Leukozyten in der Leber bei LPS-induzierter Endotoxinämie verantwortlich ist (MacDonald et al., 2013). So kommt es trotz Herabregulation des hepatischen FasR durch die DBTC4/Fas siRNA in unserer Studie zu einer starken Leukozyten-Endothelzell-Interaktion im G/L-vermittelten ALV.

Neben der Verstärkung der regionalen Entzündung, die anhand der erhöhten Leukozyten-Endothelzell-Interaktion nachgewiesen wurde, zeigt sich auch in den DBTC4/Fas siRNA therapierten ALV-Gruppen eine schwere systemische Inflamationsreaktion. Dies belegen unsere Ergebnisse der Blutplasma-Analyse der IL-6-Konzentrationen, welche trotz FasR Herabregulation signifikante Erhöhungen zeigen. Ein Rezeptorsystem, welches in der Lage ist, das angeborene Immunsystem zu aktivieren und auf den Hepatozyten exprimiert wird, sind die TLRs. TLRs sind oberflächliche und intrazelluläre Rezeptoren, die molekulare Bestandteile von Viren, Bakterien und Parasiten erkennen, darunter PAMPs wie Nukleinsäuren, Proteine, Fett- und Kohlenstoffanteile und daraufhin das angeborene Immunsystem aktivieren. Es gibt mehrere Subtypen von TLRs, zu den wichtigsten zählen TLR-3, -4, und -9. Auf den verschiedenen Zellpopulationen der Leber werden nahezu alle bekannten TLRs exprimiert. Dies verdeutlicht auch die Funktion der Leber als Vermittler von Reaktionen des angeborenen Immunsystems, da die Leber mit dem Großteil des Bluts aus dem Gastrointestinaltrakt in Kontakt kommt und damit zahlreichen PAMPs der normalen Darmkommensalen und potentiell pathogenen Erregern in Berührung kommt (Bigorgne und Crispe, 2010). Dies widerspiegelt sich auch in der Vielzahl ortsständiger Makrophagen und den ausgedehnten Endotheloberflächen der Leber (Chen et al., 1996). TLR-4 spielt für unsere Studie eine besonders wichtige Rolle, da dieser Rezeptor durch LBP-gebundenes LPS aktiviert wird und damit einen weiteren potentiellen Aktivator des angeborenen Immunsystems darstellt (Wright et al., 1989). Des Weiteren werden TLRs auch von DAMPs wie nukleärer DNA, HMBG1 und RNA aktiviert. Nach Aktivierung vermitteln TLRs ihre Effekte über verschiedene intrazelluläre Signalkaskaden, die durch fünf verschiedene Toll-interleukin-1 receptor (TIR) domains charakterisiert sind. Die beiden wichtigsten Domänen sind das myeloid differentiation primary response gene 88 (MyD88) und TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β , die gemeinsam auch NF- κ B aktivieren. Die Aktivierung von TLR-4 auf Makrophagen durch LPS führt zu einer MyD88 vermittelten proinflammatorischen Zytokinausschüttung. So sind Mausstämme mit einem Defekt von MyD88 resistent gegen einen LPS induzierten septischen Schock und MyD88 defiziente Makrophagen schütten nach Aktivierung durch LPS keine proinflammatorischen Zytokine aus (Kawai et al., 1999). Zusammenfassend haben TLRs zwei unterschiedliche Aufgaben

im Rahmen einer Immunantwort. Sie erkennen LPS und initiieren eine Antwort des angeborenen Immunsystems und zusätzlich sind sie in der Lage eine Immunantwort zu erhalten bzw. zu verstärken, da sie auch durch DAMPs wie DNA (TLR-9), HMGB1 (TLR-4) und RNA (TLR-3) aktiviert werden (Bigorgne und Crispe, 2010, Vollmar, 2011; Zhou et al., 2011). TLR und FasR zeigen also Überschneidungen in ihren Signalkaskaden und Übereinstimmungen in ihrer Funktion als Mediatoren von Immunreaktionen, sodass es trotz Herabregulation des FasR durch die DBTC4/Fas siRNA auf Hepatozyten zur für das ALV pathophysiologisch relevanten überschießenden Antwort des angeborenen Immunsystems mit Schädigung des Leberparenchyms kommt, die sich trotz Therapie in gering erhöhten Apoptosen, Nekrosen und Perfusionsausfällen zeigt.

Allerdings reichten auch diese geringen Veränderungen der Parameter aus, um zusammen mit der massiven systemischen Inflammation, teilweise ein ALV in den Versuchstieren zu induzieren, sodass im Überlebensversuch nur 40% der Tiere überlebten. Die DBTC4/Fas siRNA konnte keine vollständige Protektion des Lebergewebes im ALV erreichen. Verschiedene Mechanismen vermitteln unabhängig vom FasR pathophysiologisch wichtige Vorgänge, die bei G/L Exposition der Versuchstiere zu einem ALV führen (Leist et al., 1996; Han et al., 2002; Ghavami et al., 2005). Zusammengefasst erfüllt die von Silence Therapeutics entwickelte DBTC4/Fas siRNA das Kriterium der Leberspezifität und ist geeignet, eine gezielte Herabregulation des FasR auf Hepatozyten hervorzurufen. In unseren Experimenten führte die Intervention mit DBTC4/Fas siRNA zur Verringerung des sinusoidalen Perfusionsverlustes mit verbesserter hepatischer Mikrozirkulation und einer signifikanten Verringerung der hepatozellulären Apoptose und Nekrose. Die FasR-initiierte Immunreaktion scheint beim ALV eine untergeordnete Rolle zu spielen, sodass im Hinblick auf die Funktionen von FasR die Apoptose und deren konsekutive Auswirkungen als Hauptursache der Funktionsstörung und des Organversagens im ALV angesehen werden können. Somit ist der FasR zwar ein vielversprechendes therapeutisches Target in der Behandlung bzw. Vorbeugung eines ALV, macht pathophysiologisch allerdings nur einen Teilaspekt der Organschädigung aus, sodass zusätzlich eine Herabregulation der überschießenden Immunantwort nötig erscheint.

5.4 Zusammenfassung

Die vorliegende Studie wurde durchgeführt, um den Einfluss einer Blockade des FasR mittels siRNA auf die Leberfunktion im Rahmen eines ALV zu untersuchen. Die Evaluation des Leberversagens erfolgte mittels intravitaler Fluoreszenzmikroskopie, Histologie, Immunhistochemie, Molekularbiologie und serologischen Bestimmungen. Das tierexperimentelle ALV wurde durch die Applikation von Galaktosamin und Lipopolysaccharid induziert und führte zu einem isolierten fulminanten akuten Leberversagen mit mikrozirkulatorischer Dysfunktion mit Perfusionsverlust, massiven Apoptose- und Nekrosevorgängen, die auch serologisch belegt wurden und zu einer massiven Entzündungsreaktion, wie IL-6 und die verstärkte Leukozyten-Endothel-Interaktion zeigten. Die therapeutische Intervention erfolgte präventiv 48 Stunden vor Induktion des ALV durch die systemische Gabe einer DBTC4/Fas siRNA, die durch den Abbau von mRNA-Leitsträngen den Zusammenbau der Fas-Rezeptor Proteine verhindern und damit eine Herabregulation der Rezeptorexpression auf Hepatozyten hervorrufen sollte. Die siRNA wurde in einer speziellen Lipoplex-Formulierung dargereicht, um den Rezeptor ausschließlich auf Hepatozyten herabzuregulieren. Der Fas-Rezeptor ist ein Apoptoserezeptor, der pathophysiologisch eine wichtige Rolle bei der Initiation einer Reaktion des angeborenen Immunsystems und beim ALV spielen soll.

Die Blockade des Fas-Rezeptors führte zu einer isolierten und wirksamen Herabregulation des Rezeptors auf Hepatozyten. Die Therapiegruppe zeigte eine signifikante Verbesserung der hepatischen Perfusion und Apoptose sowie eine gering reduzierte Leukozyten-Endothelzell-Interaktion. Serologisch waren ALT und AST signifikant geringer als in den ALV-Tieren, die IL-6 Konzentration war in der Therapiegruppe so hoch wie in den ALV-Gruppen, was als Hinweis darauf zu werten ist, dass es auch unter Therapie zu einer massiven systemischen Entzündung kommt. Dies lässt den Rückschluss zu, dass die Rolle des Fas-Rezeptors bei der Initiation der Immunreaktion im ALV eine untergeordnete Rolle spielt, obwohl die Funktionsstörung bzw. das Organversagen durch die Intervention mit siRNA reduziert und teilweise verhindert werden konnte. Die Letalität des ALV konnte durch die DBTC4/Fas siRNA um 40% im Überlebensversuch verringert werden. In der vorliegenden Studie wurde eine siRNA erfolgreich *in vivo* eingesetzt, um eine Leberprotektion im Rahmen eines G/L-induzierten ALV zu erreichen.

Tierexperimentell könnten in Zukunft Versuche mit Paracetamol- oder Amanitin-Intoxikationen durchgeführt werden, da beide Modelle von großer klinischer Relevanz sind. Auch könnten Untersuchungen zu Ischämie-Reperfusion-Versuchen erfolgen, die im Hinblick auf die Organtransplantation und die Erhaltung der Organfunktion relevant sind.

Mit der Entwicklung weiterer Applikationszusätze, die die Halbwertszeit des FasR auf Zielzellen

reduzieren, könnte dadurch eine siRNA mit therapeutischer Bedeutung, zumindest im Hinblick auf weitere experimentelle Studien, entstehen. Da sich ein Leberversagen beim Menschen über mehrere Tage erstreckt, erscheint eine klinische Anwendung durchaus sinnvoll. Bis dahin wären die klinischen Phasen der Medikamentenzulassung zu absolvieren. Weiterhin könnte die DBTC4/Fas siRNA präventiv Anwendung bei geplanten Eingriffen mit der Gefahr eines ALV oder einer Sepsis finden, da hier das ALV im Vergleich zu anderen Organversagen letalitäts- und morbiditätsbestimmend ist.

6 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ANOVA	analysis of variance
ALT	Aspartat-Aminotransferase
ALV	Akutes Leberversagen
AST	Aspartat-Aminotransferase
ATP	Adenosintriphosphat
Bcl-2	B-cell lymphoma
CAE	Chloracetat-Esterase
CD	cluster of differentiation
DAMP	damage-associated molecular pattern
FasL	Fas Ligand
FasR	Fas Rezeptor
FADD	Fas associated death domain
D-Galn	Galaktosamin
GF	Gesichtsfeld
G/L	Galaktosamin/Lipopolysaccharid
HE	Hämatoxylin-Eosin
HEP	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HMGB1	high mobility group B1 protein
LPS	Lipopolysaccharid
ICAM-1	Interzelluläres Adhäsionsmolekül-1
IL	Interleukin
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
IVM	Intravitalmikroskopie/Intravitalmikroskop
KC	Kupfferzelle
Ket	Ketamin
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
mg	Milligramm
miRNA	micro Ribonukleinsäure
MyD88	myeloid differentiation primary response gene 88
NaCl	0,9%ige Natriumchloridlösung

NF- κ B	nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
nm	Nanometer
PAMP	pathogen-associated molecular pattern
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PMN	polymorphonuclear neutrophil
PRR	pattern recognition receptor
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
siRNA	small interfering RNA
TLR	Toll-like receptor
TIR	Toll-interleukin-1 receptor
TNF- α	Tumor-Nekrose-Faktor- α
TNFR	Tumornekrose-Faktor-Rezeptor
Xyl	Xylazin

7 Literaturverzeichnis

- Ameisen JC. The origin of programmed cell death. *Science*. 1996;266:1278-1279.
- Antoniades CG, Berry PA, Wendon JA, Vergani D. The Importance of immune dysfunction in determining outcome in acute liver failure. *Journal of Hepatology* 2008;49:845-861.
- Afford SC, Randhawa S, Eliopoulos AG, Hubscher SG, Young LS, Adams DH. CD40 activation induces apoptosis in cultured human hepatocytes via induction of cell surface fas ligand expression and amplifies fas-mediated hepatocyte death during allograft rejection. *J Exp Med*. 1999;189:441-446.
- Aird WC. The role of the endothelium in severe sepsis and multiple organ dysfunction syndrome. *Blood*. 2003;101:3765-3777.
- Alderson MR, Armitage RJ, Maraskovsky E, Tough TW, Roux E, Schooley K, Ramsdell F, Lynch DH. Fas transduces activation signals in normal human T lymphocytes. *J Exp Med*. 1993;223:2231-2235.
- Anukarahanonta T, Shinozuka H, Farber E. Inhibition of protein synthesis in rat liver by D-galactosamine. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol*. 1973;5:481-491.
- Arras M, Autenried P, Rettich A, Spaeni D, Rülcke T. Optimization of intraperitoneal injection anesthesia in mice: drugs, dosages, adverse effects, and anesthesia depth. *Comp Med*. 2001;51:443-456.
- Bantel H, Lügering A, Poremba C, Lügering N, Held J, Domschke W, Schulze-Osthoff K. Caspase activation correlates with the degree of inflammatory liver injury in chronic hepatitis C virus infection. *Hepatology*. 2001;34:758-767.
- Barnhart BC, Alappat EC, Peter ME. The CD95 type I/type II model. *Semin Immunol*. 2003;3:185-193.
- Barnhart BC, Legembre P, Pietras E, Bubici C, Franzoso G, Peter ME. CD95 ligand induces motility and invasiveness of apoptosis resistant tumor cells. *The EMBO Journal* 2004;23:3175-3185.
- Bartel DP. MicroRNAs: Genomics, biogenesis, mechanism and function. *Cell* 2004;116:281-297.
- Bataller R, Ginès P, Nicolás JM, Görgbig MN, Garcia-Ramallo E, Gasull X, Bosch J, Arroyo V, Rodés J. Angiotensin II induces contraction and proliferation of human hepatic stellate cells. *Gastroenterology*. 2000;6:1149-1156.
- Bateman RM, Sharpe MD, Ellis CG. Bench-to-bedside review: microvascular dysfunction in sepsis-hemodynamics, oxygen transport, and nitric oxide. *Crit Care*. 2003;7:359-373.
- Baveja R, Kresge N, Ashburn JH, Keller S, Yokoyama Y, Sonin N, Zhang JX, Huynh T, Clemens MG. Potentiated hepatic microcirculatory response to endothelin-1 during polymicrobial sepsis. *Shock* 2002;5:415-422.
- Becker KA, Henry B, Ziobro R, Tümmler B, Gulbins E, Grassmé H. Role of CD95 in pulmonary inflammation and infection in cystic fibrosis. *J Mol Med* 2012;90:1011-1023.
- Beier CP, Kölbl M, Beier D, Woertgen C, Bogdahn U, Brawanski A. CD95/Fas mediates cognitive improvement after traumatic brain injury. *Cell Res*. 2007;17:732-734.
- Bélanger M, Butterworth RF. Acute liver failure: a critical appraisal of available animal models. *Metab Brain Dis*. 2005;20:409-423.
- Bernal W, Auzinger G, Dhawan A, Wendon J. Acute liver failure. *Lancet* 2010;376:190-201.
- Berr F, Schiefke I, Vogel W. Leberversagen. *Medizinische Therapie* 2005/2006, 2. Auflage; Springer Berlin Heidelberg 2005:860-870.
- Bhogal RH, Weston CJ, Curbishley SM, Adams DH, Afford SC, Langsley G. Activation of CD40 with Platelet Derived CD154 Promotes Reactive Oxygen Species Dependent Death of Human Hepatocytes during Hypoxia and Reoxygenation. *PLoS ONE*. 2012;7:308-367.
- Bigorgne AE, Crispe IN. TLRs in Hepatic Cellular Crosstalk. *Gastroenterol Res Pract*. 2010;618-260.
- Bird GL, Sheron N, Goka AK, Alexander GJ, Williams RS. Increased plasma tumor necrosis factor in severe alcoholic hepatitis. *Ann Intern Med* 1990;112:917-920.

- Boatright KM, Renatus M, Scott FL, Sperandio S, Shin H, Pedersen IM. A unified model for apical caspase activation. *Mol Cell* 2003;11:529-541.
- Boussekey N, Darmon R, Langlois J, Alfandari S, Devos P, Meybeck A. Resuscitation with low volume hydroxyethylstarch 130 kDa/0.4 is not associated with acute kidney injury. *Crit Care* 2010;1440.
- Brint E, O'Callaghan G, Houston A. Life in the Fas lane: differential outcomes of Fas signaling. *Cell Mol Life Sci.* 2013.
- Budihardjo I, Oliver H, Lutter M, Luo X, Wang X. Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 1999;15:269-290.
- Buras JA, Holzmann B, Sitkovsky M. Animal models of sepsis: setting the stage. *Nat Rev Drug Discov.* 2005;4:854-865.
- Canbay A, Tacke F, Hadem J, Trautwein C, Gerken G, Manns MP. Acute liver failure: a life-threatening disease. *Dtsch. Arztebl. Int.* 2011;108:714-720.
- Carè A, Catalucci D, Felicetti F, Bonci D, Addario A, Gallo P. MicroRNA-133 controls cardiac hypertrophy. *Nat Med.* 2007;13:613-618.
- Carswell EA, Old LJ, Kassel RL, Green S, Fiore N, Williamson B. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1975;72:3666-3670.
- Chen YR, Wang X, Templeton D, Davis RJ, Tan TH. The role of c-Jun N-terminal kinase (JNK) in apoptosis induced by ultraviolet C and gamma radiation. Duration of JNK activation may determine cell death and proliferation. *J Biol Chem.* 1996;50:31929-1936.
- Chosay JG, Essani NA, Dunn CJ, Jaeschke H. Neutrophil margination and extravasation in sinusoids and venules of liver during endotoxin-induced injury. *Am J Physiol.* 1997;272:1195-1200.
- Christ B, Brückner S. Rodent animal models for surrogate analysis of cell therapy in acute liver failure. *Front Physiol.* 2012;3:78.
- Ciz M, Denev P, Kratchanova M, Vasicek O, Ambrozova G, Lojek A. Flavonoids inhibit the respiratory burst of neutrophils in mammals. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity.* 2012:1-6.
- Cohen J. The immunopathogenesis of sepsis. *Nature.* 2002;420:885-891
- Contreras JL, Vilatoba M, Eckstein C, Bilbao G, Anthony TJ; Eckhoff DE. Caspase-8 and caspase-3 small interfering RNA decreases ischemia/reperfusion injury to the liver in mice. *Surgery.* 2004;136:390-400.
- Crimi E, Sica V, Williams-Ignarro S, Zhang H, Slutsky AS, Ignarro LJ, Napoli C. The role of oxidative stress in adult critical care. *Free Radic Biol Med.* 2006;40:398-406.
- Cursio R, Gugenheim J, Ricci JE, Crenesse D, Rostagno P, Maulon L. A caspase inhibitor fully protects rats against lethal normothermic liver ischemia by inhibition of liver apoptosis. *FASEB J.* 1999;13:253-261.
- Decker K, Keppler D. Galactosamine hepatitis: key role of the nucleotide deficiency period, the pathogenesis of cell injury and cell death. *Rev Physiol Biochem Pharmacol.* 1974;71:77-106.
- Denk S, Perl M, Huber-Lang M. Damage- and pathogen-associated molecular patterns and alarmins: keys to sepsis? *Eur Surg Res.* 2012;48:171-179.
- Desbarats J, Birge R. B., Mimouni-Rongy M., Weinstein D. E., Palerme J. S. and Newell MK. Fas engagement induces neurite growth through ERK activation and p35 upregulation. *Nat. Cell Biol.* 2003;5:118-125.
- Desbarats J, Wade T, Wade WF, Newell MK. Dichotomy between naïve and memory CD4(+) T cell responses to Fas engagement. *Proc Natl Acad Sci* 1999;96:8104-8109.
- Dienes HP, Drebber U. Pathology of immune-mediated liver injury. *Dig Dis* 2010;28:57-62.
- Eguia L, Materson BJ. Acetaminophen-related acute renal failure without fulminant liver failure. *Pharmacotherapy.* 1997;17:363-370.

- Eipel C, Bordel R, Nickels RM, Menger MD, Vollmar B. Impact of leukocytes and platelets in mediating hepatocyte apoptosis in a rat model of systemic endotoxemia. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2004;286:769-776.
- Engel C, Brunkhorst F, Bone HG, Brunkhorst R, Gerlach H, Grond S. Epidemiology of sepsis in Germany: results from a national prospective multicenter study. *In: Intensive Care Med* 2007;33:606-618.
- Faouzi S, Burckhardt BE, Hanson JC, Campe CB, Schrum LW, Rippe RA, Maher JJ. Anti-Fas induces hepatic chemokines and promotes inflammation by an NF-kappa B-independent, caspase-3-dependent pathway. *J. Biol. Chem.* 2001;276:49077-49082.
- Farnand AW, Eastman AJ, Herrero R, Hanson JF, Mongovin S, Altemeier WA, Matute-Bello G, Fas activation in alveolar epithelial cells induces KC (CXCL1) release by a MyD88-dependent mechanism. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2011;45:650-658.
- Faurschou M, Borregaard N. Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. *Microbes Infect.* 2003;5:1317-1327.
- Feldstein AE, Canbay A, Angulo P, Taniai M, Burgart LJ, Lindor KD et al. Hepatocyte apoptosis and fas expression are prominent features of human nonalcoholic steatohepatitis. *Gastroenterology* 2003; 125: 437-443.
- Formigli L, Papucci L, Tani A, Schiavone N, Tempestini A, Orlandini GE. Aponecrosis: morphological and biochemical exploration of a syncretic process of cell death sharing apoptosis and necrosis. *J Cell Physiol*. 2000;182:41-49.
- Galanos C, Freudenberg MA, Reutter W. Galactosamine-induced sensitization to the lethal effects of endotoxin. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1979;76:5939-5943.
- Galle PR, Hofmann WJ, Walczak H, Schaller H, Otto G, Stremmel W, Krammer PH, Runkel L. Involvement of the CD95 (APO-1/Fas) receptor and ligand in liver damage. *J Exp Med*. 1995;5:1223-1230.
- Ghavami S, Hashemi M, Kadhoda K, Alavian SM, Bay GH, Los M. Apoptosis in liver diseases - detection and therapeutic applications. *Med Sci Monit* 2005;11:337-345.
- Giladi H, Ketzinel-Gilad M, Rivkin L, Felig Y, Nussbaum O, Galun E. Small interfering RNA inhibits hepatitis B virus replication in mice. *Mol Ther*. 2003;8:769-776.
- Goldman D, Bateman RM, Ellis CG. Effect of sepsis on skeletal muscle oxygen consumption and tissue oxygenation: interpreting capillary oxygen transport data using a mathematical model. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2004;287:2535-2544.
- Griffith TS, Brunner T, Fletcher M, Green DR, Ferguson TA. Fas ligand-induced apoptosis as a mechanism of immune privilege. *Science* 1995;270:1189-1192.
- Halliwell B. Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? *Lancet*. 1994;344:721-724.
- Han LH, Sun WS, Ma CH, Zhang LN, Liu SX, Zhang Q, Gao LF, Chen YH. Detection of soluble TRAIL in HBV infected patients and its clinical implications. *World J Gastroenterol* 2002;8:1077-1080
- Hanna SS, Pagliarello G, Ing A. Liver blood flow after major hepatic resection. *Can. J. Surg.* 1988;31: 363-367.
- Hansford JR, Pal M, Poplawski N, Haan E, Boog B, Ferrante Antonio. In utero and early postnatal presentation of autoimmune lymphoproliferative syndrome in a family with a novel FAS-mutation. *Haematologica*. 2013;98:38-39.
- Hatwalne MS. Free radical scavengers in anaesthesiology and critical care. *Indian J Anaesth* 2012;56: 227.
- Hefeneider H, Cornell KA, Brown LE, Bakke AC, McCoy L, Bennett RM. Nucleosomes and DANN bind to specific cell-surface molecules on murine cells and induce cytokine production. *Clin Immunol Immunopathol*. 1992;63:245-251.

- Hiramatsu N, Hayashi N, Katayama K, Mochizuki K, Kawanishi Y, Kasahara A, Fusamoto H, Kamada T. Immunohistochemical detection of Fas antigen in liver tissue of patients with chronic hepatitis C. *Hepatology*. 1994;19:1354-1359.
- Hörner C, Bouchon A, Bierhaus A, Nawroth PP, Martin E, Bardenheuer HJ, Weigand MA. Role of the innate immune response in sepsis. *Anaesthesist*. 2004;1:10-28.
- Hsu H, Xiong J, Goeddel DV. The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-kappa B activation. *Cell*. 1995;4:495-504.
- Hsu H, Huang J, Shu HB, Baichwal V, Goeddel DV. TNF-dependent recruitment of the protein kinase RIP to the TNF receptor-1 signaling complex. *Immunity*. 1996;4:387-396.
- Hsu H, Shu HB, Pan MG, Goeddel DV. TRADD-TRAF2 and TRADD-FADD interactions define two distinct TNF receptor 1 signal transduction pathways. *Cell*. 1996;2:299-308.
- Hutchins NA, Chung C, Borgerding JN, Ayala CA, Ayala A. Kupffer cells protect liver sinusoidal endothelial cells from Fas-dependent apoptosis in sepsis by down-regulating gp130. *Am J Pathol*. 2013;182:742-754.
- Jaeschke H, Farhood A, Smith CW. Neutrophils contribute to ischemia/reperfusion injury in rat liver in vivo. *FASEB J*. 1990;4:3355-3359.
- Jaeschke H, Farhood A, Smith CW. Neutrophil-induced liver cell injury in endotoxin shock is a CD11b/CD18-dependent mechanism. *Am J Physiol*. 1991;261:1051-1056.
- Jaeschke H, Fisher MA, Lawson JA, Simmons CA, Farhood A, Jones DA. Activation of caspase 3 (CPP32)-like proteases is essential for TNF-alpha-induced hepatic parenchymal cell apoptosis and neutrophil-mediated necrosis in a murine endotoxin shock model. *J Immunol*. 1998;160:3480-3486.
- Jaeschke H. Inflammation in response to hepatocellular apoptosis. *Hepatology*. 2002;35:964-966.
- Jaeschke H, Hasegawa T. Role of neutrophils in acute inflammatory liver injury. *Liver Int*. 2006;26:912-919.
- Joshua-Tor L, Hannon GJ. Ancestral roles of small RNAs: an Ago-centric perspective. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2011;3:3772.
- Jost PJ, Grabow S, Gray D, McKenzie MD, Nachbur U, Huang DCS, Bouillet P, Thomas HE, Borner C, Silke J, Strasser A, Kaufmann T. XIAP acts as a switch between type I and type II FAS-induced apoptosis signalling. *Nature*. 2009;460:1035-1039.
- Kahn D, van Hoorn-Hickman R, Terblanche J. Liver blood flow after partial hepatectomy in the pig. *Journal of Surgical Research* 1984:290-294.
- Kang M, Schneider DB, Lin Z, Hanahan D, Dichek DA, Stock PG, Baekkeskov S. Fas ligand expression in islets of Langerhans does not confer immune privilege and instead targets them for rapid destruction. *Nat Med*. 1997;3:738-743.
- Kapral C, Buder R, Binder M, Csillag C, Firlinger F, Gegenhuber A, Überall B, Wewalka F, Lenz K. Leberversagen bei Sepsis und Multiorganversagen. *Journal für Gastroenterologische und Hepatologische Erkrankungen*. 2005;3:7-12.
- Katagiri H, Ito Y, Ishii K, Hayashi I, Suematsu M, Yamashina S, Murata T, Narumiya S, Kakita A, Majima M. Role of thromboxane derived from COX-1 and -2 in hepatic microcirculatory dysfunction during endotoxemia in mice. *Hepatology* 2004;1:139-150.
- Kawahara H, Matsuda Y, Takase S. Is apoptosis involved in alcoholic hepatitis? *Alcohol Suppl*. 1994;29:113-118.
- Kawai T, Adachi O, Ogawa T, Takeda K, Akira S. Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin. *Immunity* 1999;1:115-122.
- Ke Bibo, Shen X, Gao F, Tsuchihashi S, Farmer DG, Briscoe David. The CD154-CD40 T-cell co-stimulation pathway in liver ischemia and reperfusion inflammatory responses. *Transplantation* 2005;79:1078-1083.

- Keppler D, Lesch R, Reutter W, Decker K. Experimental hepatitis induced by D-galactosamine. *Exp Mol Pathol.* 1968;9:279-290.
- Keppler D, Decker K. Mechanism of action of D-galactosamine in the liver. *Verh. Dtsch. Ges. Inn. Med.* 1971;1975-1982.
- Kimura K, Taguchi T, Urushizaki I, Ohno R, Abe O, Furue H, Hattori T, Ichihashi H, Inoguchi K, Majima H. Phase I study of recombinant human tumor necrosis factor. *Cancer Chemother Pharmacol* 1987;20:223-229.
- Klas C, Debatin KM, Jonker RR, Krammer PH. Activation interferes with the APO-1 pathway in mature human T cells. *Int Immunol.* 1993;5:625-630.
- Kondo T, Suda T, Fukuyama H, Adachi M, Nagata S. Essential roles of the Fas ligand in the development of hepatitis. *Nat Med.* 1997;4:409-413.
- Kubes P, Mehal WZ. Sterile inflammation in the liver. *Gastroenterology.* 2012;143:1158-1172.
- Kuchmiy AA, Efimov GA, Nedospasov A. Methods for in vivo molecular imaging. *Biochemistry Mosc.* 2012;77:1339-1353.
- Kuhla A, Eipel C, Siebert N, Abshagen K, Menger MD, Vollmar B. Hepatocellular apoptosis is mediated by TNF α -dependent Fas/FasLigand cytotoxicity in a murine model of acute liver failure. *Apoptosis* 2008;13:1427-1438.
- Lambert C, Landau AM, Desbarats J. Fas-beyond death: a regenerative role for Fas in the nervous system. *Apoptosis.* 2003;6:551-562.
- Le Minh K, Klemm K, Abshagen K, Eipel C, Menger MD, Vollmar Brigitte. Attenuation of Inflammation and Apoptosis by Pre- and Posttreatment of Darbepoetin- α in Acute Liver Failure of Mice. *The American Journal of Pathology.* 2007;170:1954-1963.
- Lee KH, Feig C, Tchikov V, Schickel R, Hallas C, Schütze S, Peter ME, Chan AC. The role of receptor internalization in CD95 signaling. *EMBO J.* 2006;25:1009-1023.
- Lee, WM. Recent developments in acute liver failure. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology.* 2012;26:3-16.
- Legrand M, Bezemer R, Kandil A, Demirci C, Payen D, Ince C. The role of renal hypoperfusion in development of renal microcirculatory dysfunction in endotoxemic rats. *Intensive Care Med.* 2011;37:1534-1542.
- Leist M, Gantner F, Bohlinger I, Tiegs G, Germann PG, Wendel A. Tumor necrosis factor-induced hepatocyte apoptosis precedes liver failure in experimental murine shock models. *Am J Pathol.* 1995;146:1220-1234.
- Leist M, Gantner F, Künstle G, Bohlinger I, Tiegs G, Bluethmann H, Wendel A. The 55-kD tumor necrosis factor receptor and CD95 independently signal murine hepatocyte apoptosis and subsequent liver failure. *Mol Med.* 1996;2:109-124.
- Li H, Fan X, Stoicov C, Liu JH, Zubair S, Tsai E, Ste Marie R, Wang TC, Lyle S, Kurt-Jones E, Houghton J. Human and mouse colon cancer utilizes CD95 signaling for local growth and metastatic spread to liver. *Gastroenterology.* 2009;3:934-944.
- Li X, Klintman D, Weitz-Schmidt G, Schramm R, Thorlacius H. Lymphocyte function antigen-1 mediates leukocyte adhesion and subsequent liver damage in endotoxemic mice. *British Journal of Pharmacology.* 2004;141:709-716.
- Lemasters JJ. V. Necroptosis and the mitochondrial permeability transition: shared pathways to necrosis and apoptosis. *Am J Physiol.* 1999;276:1-6.
- Lomas-Neira JL, Chung C, Wesche DE, Perl M, Ayala A. In vivo gene silencing (with siRNA) of pulmonary expression of MIP-2 versus KC results in divergent effects on hemorrhage-induced, neutrophil-mediated septic acute lung injury. *J Leukoc Biol.* 2005;77:846-853.
- Losser MR, Payen D. Mechanisms of liver damage. *Semin Liver Dis.* 1996;16:357-367.

- Lotze MT, Tracey KJ. High-mobility group box 1 protein: nuclear weapon in the immune arsenal. *Nat Rev Immunol.* 2005;5:331-342.
- Lüllmann-Rauch R. Taschenlehrbuch Histologie. 2006, 2. Aufl. Stuttgart Thieme.
- Ma Y, Liu H, Tu-Rapp H, Thiesen H, Ibrahim SM, Cole SM, Pope RM. Fas ligation on macrophages enhances IL-1R1-Toll-like receptor 4 signaling and promotes chronic inflammation. *Nat Immunol.* 2004; 5:380-387.
- Mackay F, Loetscher H, Stueber D, Gehr G, Lesslauer W. Tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha)-induced cell adhesion to human endothelial cells is under dominant control of one TNF receptor type, TNF-R55. *J Exp Med.* 1993;5:1277-1286.
- Mahmood Z, Shukla Y. Death receptors: targets for cancer therapy. *Exp Cell Res* 2010;316:887-899.
- Malhi H, Gores GJ, Lemasters JJ. Apoptosis and necrosis in the liver: a tale of two deaths? *Hepatology* 2006;43:31-44.
- Marnett LJ, Riggins JN, West JD. Endogenous generation of reactive oxidants and electrophiles and their reactions with DNA and protein. *J Clin Invest.* 2003;111:583-593.
- Martin SJ, O'Brien GA, Nishioka WK, McGahon AJ, Mahboubi A, Saido TC, Green DR. Proteolysis of fodrin (non-erythroid spectrin) during apoptosis. *J Biol Chem.* 1995;270:6425-6428.
- Mashima T, Naito M, Fujita N, Noguchi K, Tsuruo T. Identification of actin as a substrate of ICE and an ICE-like protease and involvement of an ICE-like protease but not ICE in VP-16-induced U937 apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun.* 1995;217:1185-1192
- Matuschak GM, Henry KA, Johanns CA, Lechner AJ. Liver-lung interactions following Escherichia coli bacteremic sepsis and secondary hepatic ischemia/reperfusion injury. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001 ;163:1002-1009.
- McCaffrey AP, Nakai H, Pandey K, Huang Z, Salazar FH, Xu Hui. Inhibition of hepatitis B virus in mice by RNA interference. *Nat Biotechnol.* 2003;21:639-644.
- McDonald B, Jenne CN, Zhuo L, Kimata K, Kubes P. Kupffer cells and activation of endothelial TLR4 coordinate neutrophil adhesion within liver sinusoids during endotoxemia. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2013;11:797-806.
- Mempel TR, Scimone ML, Mora JR, Andrian UH. In vivo imaging of leukocyte trafficking in blood vessels and tissues. *Curr Opin Immunol.* 2004;16:406-417.
- Messer MP, Kellermann P, Weber SJ, Hohmann C, Denk S, Klohs B. Silencing of fas, fas-associated via death domain, or caspase 3 differentially affects lung inflammation, apoptosis, and development of trauma-induced septic acute lung injury. *Shock.* 2013;39:19-27.
- Molnar RG, Wang P, Ayala A, Ganey PE, Roth RA, Chaudry IH. The role of neutrophils in producing hepatocellular dysfunction during the hyperdynamic stage of sepsis in rats. *J Surg Res.* 1997;73:117-122.
- Morikawa A, Sugiyama T, Kato Y, Koide N, Jiang GZ, Takahashi K. Apoptotic cell death in the response of D-galactosamine-sensitized mice to lipopolysaccharide as an experimental endotoxic shock model. *Infect. Immun.* 1996;64:734-738.
- Mignotte B. and Vayssiere J. L. Mitochondria and apoptosis. *Eur. J. Biochem.* 1998;252:1-15.
- Mizuhara H, Kuno M, Seki N, Yu WG, Yamaoka M, Yamashita M, Ogawa T, Kaneda K, Fujii T, Senoh H, Fujiwara H. Strain difference in the induction of T-cell activation-associated, interferon gamma-dependent hepatic injury in mice. *Hepatology* 1998;27:513-519.
- Muto Y, Nouri-Aria KT, Meager A, Alexander GJ, Eddleston AL, Williams R. Enhanced tumour necrosis factor and interleukin-1 in fulminant hepatic failure. *Lancet* 1988;2:72-74.
- Nagata S. Apoptosis by death factor. *Cell* 1997;88:355-365.
- Nagata S, Golstein P. The Fas death factor. *Science.* 1995;267:1449-1456.

- Nathan C. Specificity of a third kind: reactive oxygen and nitrogen intermediates in cell signaling J Clin Invest. 2003;111:769-778.
- Natori S, Rust C, Stadheim LM, Srinivasan A, Burgart LJ, Gores GJ. Hepatocyte apoptosis is a pathologic feature of human alcoholic hepatitis. J Hepatol. 2001;2:248-253.
- Ndozangue-Touriguine O, Sebbagh M, Mérino D, Micheau O, Bertoglio J, Bréard J. A mitochondrial block and expression of XIAP lead to resistance to TRAIL-induced apoptosis during progression to metastasis of a colon carcinoma. Oncogene. 2008;46:6012-6022.
- Neuman MG. Apoptosis in diseases of the liver. Crit Rev Clin Lab Sci 2001;38:109-166.
- Nussler A, König S, Ott M, Sokal E, Christ B, Thasler W, Brulport M, Gabelin G, Schormann W, Schulze M, Ellis E, Kraemer M, Nocken F, Fleig W, Manns M, Strom SC, Hengstler JG. Present status and perspectives of cell-based therapies for liver diseases. J Hepatol. 2006;45:144-59
- Ogasawara J, Watanabe-Fukunaga R, Adachi M, Matsuzawa A, Kasugai T, Kitamura Y, Itoh N, Suda T, Nagata S. Lethal effect of the anti-Fas antibody in mice. Nature 1993;364:806-809.
- Packham G, Lahti JM, Fee BE, Gawn JM, Coustan-Smith E, Campana D, Douglas I, Kidd VJ, Ghosh S and Cleveland JL. Fas activates NF κ -B and induces apoptosis in T-cell lines by signaling pathways distinct from those induced by TNF- α . Cell Death Differ. 1997;4:130-139
- Pagani R, Potroles MT, Arahuetes R, Ainaga MJ, Machin C, Rua C. Comparative in vivo and in vitro models to approach the cellular basis of endotoxic shock. The role of sinusoidal liver cells. Histol. Histopathol. 1996;11:597-606.
- Panis Y, McMullan DM, Emond JC. Progressive necrosis after hepatectomy and the pathophysiology of liver failure after massive resection. Surgery 1997;121:142-149.
- Palao G, Santiago B, Galindo MA, Rullas JN, Alcamí J, Ramirez JC, Pablos JL. Fas activation of a proinflammatory program in rheumatoid synoviocytes and its regulation by FLIP and caspase 8 signaling. Arthritis Rheum. 2006;5:1473-1481.
- Pascher A, Nebrig M, Neuhaus P. Irreversible liver failure: treatment by transplantation: part 3 of a series on liver cirrhosis. Dtsch Arztebl Int 2013;110:167-173.
- Paxian M, Bauer I, Rensing H, Jaeschke H, Mautes AEM, Kolb SA. Recovery of hepatocellular ATP and pericentral apoptosis after hemorrhage and resuscitation. FASEB J. 2003;17:993-1002.
- Pennington JE. Therapy with antibody to tumor necrosis factor in sepsis. Clin Infect Dis. 1993;17:515-519.
- Pianko S, Patella S, Ostapowicz G, Desmond P, Sievert W. Fas-mediated hepatocyte apoptosis is increased by hepatitis C virus infection and alcohol consumption, and may be associated with hepatic fibrosis: mechanisms of liver cell injury in chronic hepatitis C virus infection. J Viral Hepat 2001;8:406-413.
- Pittet MJ, Weissleder R. Intravital imaging. Cell. 2011;147:983-991.
- Pittman K, Kubes P. Damage-Associated Molecular Patterns Control Neutrophil Recruitment. J Innate Immun. 2013.
- Raabe BM, Artwohl JE, Purcell JE, Lovaglio J, Fortman JD. Effects of weekly blood collection in C57BL/6 mice. J Am Assoc Lab Anim Sci. 2011;50:680-685.
- Rahman TM, Hodgson HJ. Animal models of acute hepatic failure. Int J Exp Pathol. 2000;81:145-157.
- Ramachandran, PV, Ignacimuthu S. RNA interference-a silent but an efficient therapeutic tool. Appl Biochem Biotechnol. 2013;169:1774-1789.
- Ratcliff F, Harrison BD, Baulcombe DC. A similarity between viral defense and gene silencing in plants. Science. 1997;276:1558-1560.
- Remick DG, Newcomb DE, Bolgos GL, Call DR. Comparison of the mortality and inflammatory response of two models of sepsis: lipopolysaccharide vs. cecal ligation and puncture. Shock. 2000;13:110-116.

- Riedemann NC, Guo RF, Neff TA, Laudes IJ, Keller KA, Sarma VJ, Markiewski MM, Mastellos D, Strey CW, Pierson CL, Lambris JD, Zetoune FS, Ward PA. Increased C5a receptor expression in sepsis. *J Clin Invest.* 2002;110:101-108.
- Rieux-Laucat F, Le Deist F, Hivroz C, Roberts IA, Debatin KM, Fischer A, de Villartay JP. Mutations in Fas associated with human lymphoproliferative syndrome and autoimmunity. *Science.* 1995;268:1347-1349.
- Rolfe DF, Brown GC. Cellular energy utilization and molecular origin of standard metabolic rate in mammals. *Physiol Rev.* 1997;3:731-758.
- Ruan W, Lee CT, Desbarats J. A Novel Juxtamembrane Domain in Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily Molecules Activates Rac1 and Controls Neurite Growth. *Mol Biol Cell.* 2008;19:3192-3202.
- Ryo K, Kamogawa Y, Ikeda I, Yamauchi K, Yonehara S, Nagata S, Hayashi N. Significance of Fas antigen-mediated apoptosis in human fulminant hepatic failure. *Am J Gastroenterol.* 2000;95:2047-2055.
- Saetzler RK, Jallo J, Lehr HA, Philips CM, Vasthare U, Arfors KE, Tuma RF. Intravital fluorescence microscopy: impact of light-induced phototoxicity on adhesion of fluorescently labeled leukocytes. *J Histochem Cytochem.* 1997;45:505-513.
- Scaffidi C, Fulda S, Srinivasan A, Friesen C, Li F, Tomaselli KJ, Debatin KM, Krammer PH, Peter ME. Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *EMBO J.* 1998;17:1675-1687.
- Schneider P, Holler N, Bodmer JL, Hahne M, Frei K, Fontana A, Tschopp J. Conversion of membrane-bound Fas(CD95) ligand to its soluble form is associated with downregulation of its proapoptotic activity and loss of liver toxicity. *J Exp Med.* 1998;187:1205-1213.
- Scott FL, Stec B, Pop C, Dobaczewska MK, Lee JJ, Monosov E, Robinson H, Salvesen GS, Schwarzenbacher R, Riedl SJ. The Fas-FADD death domain complex structure unravels signalling by receptor clustering. *Nature* 2009;7232:1019-1022.
- Shishodia S, Aggarwal BB. Nuclear factor-kappaB activation: a question of life or death. *J Biochem Mol Biol.* 2002;35:28-40.
- Song E, Lee W, Wang J, Ince N, Ouyang N, Min J, Chen J, Shankar P, Lieberman J. RNA interference targeting Fas protects mice from fulminant hepatitis. *Nature Medicine.* 2003;347-351.
- Sperandio S, Belle I, Bredesen DE. An alternative, nonapoptotic form of programmed cell death. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2000;97:14376-81.
- Spronk PE, Zandstra DF, Ince C. Bench-to-bedside review: sepsis is a disease of the microcirculation. *Crit Care.* 2004;8:462-468.
- Steller H. Mechanisms and genes of cellular suicide. *Science.* 1995;5203:1445-9.
- Stepanenko OV, Verkhusha VV, Kuznetsova IM, Uversky VN, Turoverov KK. Fluorescent proteins as biomarkers and biosensors: throwing color lights on molecular and cellular processes. *Curr Protein Pept Sci.* 2008;9:338-369.
- Stravitz RT. Critical management decisions in patients with acute liver failure. *Chest.* 2008;134:1092-1102.
- Streetz K, Leifeld L, Grundmann D, Ramakers J, Eckert K, Spengler U, Brenner D, Manns M, Trautwein C. Tumor necrosis factor alpha in the pathogenesis of human and murine fulminant hepatic failure. *Gastroenterology* 2000;119:446-460.
- Suda T, Hashimoto H, Tanaka M, Ochi T, Nagata S. Membrane Fas ligand kills human peripheral blood T lymphocytes, and soluble Fas ligand blocks the killing. *J Exp Med.* 1997;186:2045-2050.
- Tanaka M, Tanaka K, Masaki Y, Miyazaki M, Kato M, Kotoh K, Enjoji M, Nakamuta M, Takayanagi R. Intrahepatic microcirculatory disorder, parenchymal hypoxia and NOX4 upregulation result in zonal differences in hepatocyte apoptosis following lipopolysaccharide- and D-galactosamine-induced acute liver failure in rats. *Int J Mol Med.* 2014;2:254-262.

- Tempel GE, Cook JA, Wise WC, Halushka PV, Corral D. Improvement in organ blood flow by inhibition of thromboxane synthetase during experimental endotoxic shock in the rat. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1986;3:514-519.
- Terblanche J, Hickman R. Animal models of fulminant hepatic failure. *Dig Dis Sci.* 1991;36:770-774.
- Thorlacius K, Slotta JE, Laschke MW, Wang Y, Menger MD, Jeppsson B, Thorlacius H. Protective effect of fasudil, a Rho-kinase inhibitor, on chemokine expression, leukocyte recruitment and hepatocellular apoptosis in septic liver injury. *J Leukoc Biol.* 2006;79:923-931.
- Tiegs G, Wolter M, Wendel A. Tumor necrosis factor is a terminal mediator in galactosamine/endotoxin-induced hepatitis in mice. *Biochem Pharmacol.* 1989;38:627-631.
- Trauzold A, Röder C, Sipos B, Karsten K, Arlt A, Jiang P, Martin-Subero JI, Siegmund D, Muerkoster S, Pagerols-Raluy L, Siebert R, Wajant H, Kalthoff H. CD95 and TRAF2 promote invasiveness of pancreatic cancer cells. *FASEB J.* 2005;6:620-622.
- Trewby PN, Williams R. Pathophysiology of hypotension in patients with fulminant hepatic failure. *Gut* 1977;18:1021-1026.
- Tukov FF, Luyendyk JP, Ganey PE, Roth RA. The role of tumor necrosis factor α in lipopolysaccharide ranitidine-induced inflammatory liver injury. *Toxicol Sci* 2007;100:267-280.
- Tunon MJ, Alvarez M, Culebras JM, Gonzalez-Gallego. An overview of animal models for investigating the pathogenesis and therapeutic strategies in acute hepatic failure. *World J Gastroenterol.* 2009;15:3086-3098.
- Uchino K, Ochiya T, Takeshita F. RNAi Therapeutics and Applications of MicroRNAs in Cancer Treatment. *Jpn J Clin Oncol.* 2013.
- Ulich TR, del Castillo J, Ni RX, Bikhazi N, Calvin L. Mechanisms of tumor necrosis factor α -induced lymphopenia, neutropenia, and biphasic neutrophilia: a study of lymphocyte recirculation and hematologic interactions of TNF α with endogenous mediators of leukocyte trafficking. *J Leukoc Biol.* 1989;45:155-167.
- Virág L, Szabó E, Gergely P, Szabó C. Peroxynitrite-induced cytotoxicity: mechanism and opportunities for intervention. *Toxicol Lett.* 2003;140:113-124.
- Vogler M, Walczak H, Stadel D, Haas TL, Genze F, Jovanovic M, Gschwend JE, Simmet T, Debatin KM, Fulda S. Targeting XIAP bypasses Bcl-2-mediated resistance to TRAIL and cooperates with TRAIL to suppress pancreatic cancer growth in vitro and in vivo. *Cancer Res.* 2008;19:7956-7965.
- Vollmar B. Pathophysiologische Grundlagen der chirurgisch-bedingten Sepsis. *Chirurg* 2011;82:199-207.
- Vollmar B, Glasz J, Leiderer R, Post S, Menger MD. Hepatic microcirculatory perfusion failure is a determinant of liver dysfunction in warm ischemia-reperfusion. *Am J Pathol.* 1994;145:1421-1431.
- Vollmar B, Glasz J, Menger MD, Messmer K. Leukocytes contribute to hepatic ischemia/reperfusion injury via intercellular adhesion molecule-1-mediated venular adherence. *Surgery.* 1995;117:195-200.
- Vollmar B, Glasz J, Senkel A, Menger MD, Messmer K. Role of leukocytes in the initial hepatic microvascular response to endotoxemia. *Zentralbl Chir.* 1993;118:691-696.
- Vollmar B, Menger MD. The hepatic microcirculation: mechanistic contributions and therapeutic targets in liver injury and repair. *Physiol Rev.* 2009;89:1269-1339.
- Volpe T, Schramke V, Hamilton GL, White SA, Teng G, Martienssen RA, Allshire RC. RNA interference is required for normal centromere function in fission yeast. *Chromosome Res.* 2003;11:137-146.
- Wagner JG, Roth RA. Neutrophil migration during endotoxemia. *J Leukoc Biol.* 1999;66:10-24.
- Wajant H. Principles and mechanisms of CD95 activation. *Biol Chem.* 2014;395:1401-1416.
- Wang L, Du F, Wang X. TNF- α induces two distinct caspase-8 activation pathways. *Cell.* 2008;4:693-703.

- Wanner GA, Mica L, Wanner-Schmid E, Kolb SA, Hentze H, Trentz O, Ertel W. Inhibition of caspase activity prevents CD95-mediated hepatic microvascular perfusion failure and restores Kupffer cell clearance capacity. *FASEB J* 1999;13:1239-1248.
- Watanabe-Fukunaga R, Brannan CI, Copeland NG, Jenkins NA, Nagata S. Lymphoproliferation disorder in mice explained by defects in Fas antigen that mediates apoptosis. *Nature* 1992;356:314-317.
- Wesche-Soldato DE, Chung CS, Lomas-Neira J, Doughty LA, Gregory SH, Ayala A. In vivo delivery of caspase-8 or Fas siRNA improves the survival of septic mice. *Blood*. 2005;106:2295-2301.
- Wilson NS, Dixit V, Ashkenazi A. Death receptor signal transducers: nodes of coordination in immune signaling networks. *Nat Immunol*. 2009;10:348-355.
- Wilson TR, McEwan M, McLaughlin K, Le Clorennec C, Allen WL, Fennell DA, Johnston DG, Longley DB. Combined inhibition of FLIP and XIAP induces Bax-independent apoptosis in type II colorectal cancer cells. *Oncogene* 2009;28:63-72.
- Wright SD, Tobias PS, Ulevitch RJ, Ramos RA. Lipopolysaccharide (LPS) binding protein opsonizes LPS-bearing particles for recognition by a novel receptor on macrophages. *J Exp Med*. 1989;4:1231-1241.
- Yan BZ, Yang BS, Li H, Zhang YF, Pei FH, Zhu AC, Wang XR, Liu BR. The therapeutic effect of CORM-3 on acute liver failure induced by lipopolysaccharide/D-galactosamine in mice. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*. 2016;1:73-80.
- Yoon JH, Gores GJ. Death receptor-mediated apoptosis and the liver. *J Hepatol*. 2002;3:400-410.
- Zender L, Hutker S, Liedtke C, Tillmann HL, Zender S, Mundt B. Caspase 8 small interfering RNA prevents acute liver failure in mice. *Proc Natl Acad Sci* 2003;100:7797-7802.
- Zhang Q, Raoof M, Chen Y, Sumi Y, Sursal T, Junger W, Brohi K, Itagaki K, Hauser CJ. Circulating mitochondrial DAMPs cause inflammatory responses to injury. *Nature* 2010;464:104-7.
- Zhang JX, Pegoli W Jr, Clemens MG. Endothelin-1 induces direct constriction of hepatic sinusoids. *Am J Physiol*. 1994;266:624-632.
- Zhang Y, Liu Q, Zhang M, Yu Y, Liu X, Cao X. Fas signal promotes lung cancer growth by recruiting myeloid-derived suppressor cells via cancer cell-derived PGE2. *J Immunol*. 2009;6:3801-3808.
- Zhang X, Liu Y, Zhang G, Shi J, Zhang X, Zheng X, Jiang AT, Zhang ZX, Johnston N, Sun Siu K, Chen R, Lian D, Koos D, Quan D, Min WP. Synergic silencing of costimulatory molecules prevents cardiac allograft rejection. *Transl Med*. 2014;12:142.
- Zhou RR, Zhao SS, Zou MX, Zhang P, Zhang BX, Dai XH, Li N, Liu HB, Wang H, Fan XG. HMGB1 cytoplasmic translocation in patients with acute liver failure. *BMC Gastroenterol*. 2011;11:21.

8 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Ausführungen, die anderen Schriften wörtlich oder sinngemäß entnommen wurden, wurden kenntlich gemacht. Die Arbeit war in gleicher oder ähnlicher Fassung noch nicht Bestandteil einer Studien- oder Prüfungsleistung.

Michael Thrum

9 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. med. Brigitte Vollmar, der Direktorin des Instituts für Experimentelle Chirurgie der Universität Rostock, für die Möglichkeit, meine experimentellen Versuche durchführen und diese Arbeit an Ihrem Institut verfassen zu können.

Auch besonders möchte ich mich bei Frau PD Dr. rer. nat. Angela Kuhla bedanken. Sie war während des gesamten Zeitraumes meiner Arbeit eine geduldige und stets hilfsbereite Betreuerin, deren Zuspruch mir im Prozess dieser Promotion sehr geholfen hat.

Ich möchte an dieser Stelle meiner Familie danken. Meiner eigenen, die mich sehr glücklich macht und mir Kraft gibt. Meinen Eltern, die mich zu demjenigen gemacht haben, der ich bin. Meinen beiden Brüdern, die stets dafür Sorge tragen, dass ich nicht vergesse, wer ich bin.

Publikation:*Peer-review Originalarbeit:*

Kuhla A, Thrum M, Schaeper U, Fehring V, Schulze-Topphoff U, Abshagen K, Vollmar B. Liver-specific Fas silencing prevents galactosamine/lipopolysaccharide-induced liver injury. Apoptosis. 2015 Apr;20(4):500-11. doi: 10.1007/s10495-015-1088-2.

10 Thesen zur Dissertation

1. Das Akute Leberversagen ist ein seltenes und schwerwiegendes Krankheitsbild, dessen Behandlung großen intensivmedizinischen Aufwand erfordert. Trotz Verbesserungen therapeutischer Regimes und hohem Ressourcenaufwand ist das akute Leberversagen mit einer hohen Letalität und Morbidität vergesellschaftet. Kausale Therapieansätze gibt es nur in bestimmten Fällen.

2. Der Fas-Rezeptor ist nicht nur ein Apoptoserezeptor, sondern spielt auch indirekt bei der Initiierung von Immunreaktionen eine wichtige Rolle. Die Fas-Rezeptor vermittelte Immunreaktion führt im Rahmen einer Galactosamin- und Lipopolysaccharid-induzierten Entzündungsreaktion zu einem hepatischen Perfusionsverlust mit massiven Apoptose- und Nekrosevorgängen und einer Infiltration des Lebergewebes mit neutrophilen Granulozyten, deren Abwehrmechanismen Kollateralschäden am körpereigenen Gewebe verursachen.

3. Die RNA-Interferenz stellt einen hochspezifischen Mechanismus zur post-transkriptionellen Gen-silencing dar. Durch die Applikation externer doppelsträngiger siRNA kann die Expression ausgewählter Proteine in einem Gewebe gezielt reguliert werden.

4. Die systemische Applikation einer siRNA, die gegen den Fas-Rezeptor gerichtet ist, resultiert in reduzierten mRNA-Konzentration und einer verminderten Expression des Fas-Rezeptors auf Hepatozyten. Die in der vorliegenden Studie erhobenen Parameter zeigen eine signifikante Verbesserung der hepatischen Perfusion, eine geringere Leukozyteninfiltration und eine signifikante Verringerung der Apoptoserate bei akutem Leberversagen.

5. Die verwendete DBTC4/Fas siRNA stört die RNA- und Proteinhomöostase in Hepatozyten unter physiologischen Bedingungen nicht. Die Verabreichung einer non-sense-siRNA (DBTC4/Luci siRNA) führt zu keiner Verbesserung der erhobenen

Parameter.

6. Die verwendete Lipoplex-Formulierung zur gezielten Einbringung der siRNA ist leberspezifisch. Die Fas-mRNA-Konzentrationen anderer Gewebe wie Herz, Lunge oder Niere wurden nicht beeinflusst. Dadurch sollen systemische Nebenwirkungen einer Fas-Defizienz verhindert werden.

7. Die Applikation von DBTC4/Fas siRNA führte zu einer Verringerung der Letalität des akuten Leberversagens im Tiermodell.